

T H E S E S

présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITE DE PARIS

pour Obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES PHYSIQUES

par

Monsieur Stanislas LEWAK

PREMIERE THESE : Synthèses et réactions des acides gluco-
métasacchariniques phosphorylés.

DEUXIEME THESE : Propositions données par la Faculté

Soutenues le

2 JUIN 1960

devant la Commission d'Examen

M. Ch. PREVOST

Président

Melle E. LE BRETON

Examineurs

M. M. JULIA

Ce travail a pu être mené à bien grâce à une bourse de Coopération Technique Internationale que m'avait accordé Monsieur le Directeur Général des Affaires Culturelles et Techniques du Ministère des Affaires Etrangères,

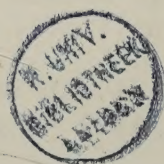
Qu'il me soit permis d'exprimer ici ma profonde reconnaissance au Gouvernement Français pour sa généreuse confiance.

Cette Thèse a été préparée au Centre de Recherches Physiologiques sur la Cellule Normale et Cancéreuse du Centre National de la Recherche Scientifique, que dirige le Professeur E. LeBreton,

Je tiens à lui exprimer ma respectueuse gratitude pour l'accueil et l'hospitalité qu'elle a bien voulu m'accorder dans son Institut.

Monsieur L. Szabo, Maître de Recherches, m'a fourni le sujet de ma Thèse: je le remercie de ses précieux conseils et de toute l'aide qu'il m'a apportée au cours de l'exécution de ce travail.

Les Autorités de l'Université de Varsovie m'ont généreusement accordé un congé, pour me permettre d'entreprendre et de terminer ma Thèse: qu'ils trouvent ici l'expression de ma sincère gratitude.



INTRODUCTION.

Toutes les recherches qui visent à approfondir notre connaissance de la structure fine de la cellule vivante, inévitablement touchent le domaine des acides nucléiques. La grande importance de cette classe de substances explique l'énorme progrès et l'évolution de la chimie, de la physique et de la biochimie des acides nucléiques et de leurs constituants.

Les premiers travaux sur les acides nucléiques datent de l'année 1871 (1). Les cinquante années suivantes ont apporté la reconnaissance, comme éléments communs des acides nucléiques, de quatre bases hétérocycliques, de deux sucres et de l'acide phosphorique. La différence fondamentale entre les deux types d'acides nucléiques - l'un contenant comme élément glucidique le ribose l'autre le désoxyribose - fut également découverte (2,3,4).

La science contemporaine a établi la structure des nucléosides et nucléotides, éléments constitutants des acides nucléiques. On a découvert que le rapport entre les acides désoxyribonucléiques et acides ribonucléiques est beaucoup plus élevé dans le noyau cellulaire que dans le cytoplasme. Le rôle des nucléoprotéines nucléaires dans la division de la cellule, dans le phénomène de l'hérédité et probablement aussi dans l'apparition et l'évolution du cancer (5) attire de plus en plus l'intérêt des chercheurs sur ce groupe de composés. Dans ces recherches les études portant sur le

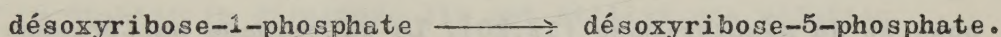
2-désoxyribose-5-phosphate occupent une place particulière.

En examinant les désoxyribonucléosides, obtenus par dégradation enzymatique des acides nucléiques du thymus, MANSON et LAMPEN (6) ont établi, à l'aide de titrage avec le periodate, que la partie glucidique des nucléosides existe sous la forme furanoïde. Ce fait exclut la possibilité de l'existence d'un résidu phosphorique esterifiant le groupe hydroxyle lié au quatrième atome de carbone du désoxyribose dans les désoxyribonucléotides et les acides désoxyribonucléiques. Les travaux de CARTER (7) ont démontré que dans les désoxyribonucléotides, obtenus à partir de DNA par traitement enzymatique, le résidu phosphorique n'est lié qu'avec le groupe hydroxyle du carbone 5 du désoxyribose. L'importance du 2-désoxyribose-5-phosphate était ainsi démontré, mais malgré le grand nombre de travaux apparus récemment et consacrés à ce glucide, les voies de la biosynthèse du désoxyribose-5-phosphate ne sont pas connues. Les recherches n'apportent que des observations isolées concernant certains aspects de la biosynthèse par des microorganismes et tissus animaux isolés: ils ne permettent pas de dresser un tableau général du problème.

BAGATELL, WRIGHT et SABLE (8), étudiant la formation des pentoses chez *Escherichia coli* et utilisant l'acétate marqué, $^{14}\text{CH}_3\text{COO}^-$, comme seule source de carbone, ont trouvé les RNA et DNA radioactifs, dans lesquels l'activité du ribose et désoxyribose était la même mais elle différait de celle du glucose isolé à partir du même microorganisme. Cette expérience suggère un mécanisme semblable pour la biosynthèse de ces deux pentoses, celui-ci ne pouvant cependant pas être la décarboxylation oxydative du glucose ou du gluconate. Ces résultats ne sont pas en accord avec le schéma de HORECKER, SMYRNIOTIS et SEEGMILLER (9) qui ont proposé une route commune de la biosynthèse des phosphates des pentoses passant par le gluconate-6-phosphate, acide 2-cétogluconique-6-phosphate et ribulose-5-phosphate.

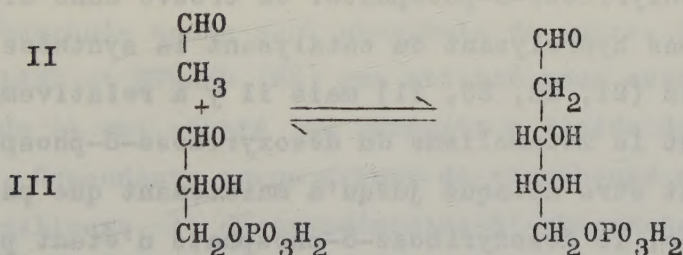
D'autres expériences effectuées à l'aide de carbone ^{14}C parlent aussi en faveur de la possibilité d'une voie commune de la biosynthèse des deux pentoses, constituants des acides nucléiques: ainsi la conversion de ribonucléosides marqués en désoxyribonucléosides dans les cellules bactériennes et chez le rat (10) a été établie. Cette transformation s'effectue sans rupture de la liaison glycosidique ni fragmentation de la chaîne carbonée du sucre.

En 1951, MANSON et LAMPEN (11) ont décrit la phosphorolyse de l'hypoxanthine désoxyriboside, donnant en présence de phosphate inorganique la base libre et du désoxyribose-1-phosphate. Ce composé subit ensuite l'action d'un autre enzyme qui catalyse la réaction:



TARR (12) a décrit, en 1957, une autre réaction intéressante du désoxyribose-1-phosphate: ce composé réagit avec le ribose-1,5-diphosphate pour donner du désoxyribose-1,5-diphosphate. Ce diphosphate joue probablement un rôle dans la formation des désoxyribonucléotides (13,14).

Une autre réaction enzymatique menant à la synthèse du désoxyribose-5-phosphate a été découverte par RACKER (15, 16): l'aldolase du désoxyribose, isolée des cultures de *E. coli* et de *Corynebacterium diphtheriae*, catalyse une réaction réversible entre le glycéraldéhyde-3-phosphate (III) et l'acétaldéhyde (II):



Un enzyme catalysant la même réaction a été trouvé aussi dans le foie de cobayes et de rats (17, 18). Le glycéraldéhyde phosphate nécessaire pour cette synthèse peut être formé à partir d'autres phosphates de sucres. Racker a obtenu du désoxyribose-5-phosphate en présence du même enzyme en remplaçant le triose phosphate par le fructose-1,6-diphosphate, le ribose-5-phosphate ou le ribulose-5-phosphate. Cette observation expliquerait la conversion des phosphates de pentoses en désoxyribose-5-phosphate notée précédemment. Il est à remarquer cependant que l'acétaldéhyde n'est pas un constituant cellulaire normal.

La route directe de la formation du désoxyribose-5-phosphate par phosphorylation du désoxyribose dans les tissus est également connue, le même enzyme catalysant l'esterification du ribose et du désoxyribose (19,20). La ribokinase bactérienne ou celle du foie de veau phosphoryle sélectivement le groupe hydroxyle primaire du carbone 5 du sucre. L'enzyme catalysant aussi bien l'esterification du ribose que celle du désoxyribose semble être peu sélectif. Pourtant, la ribokinase du foie est inactive envers les hexoses et même envers les autres pentoses: l'arabinose, le ribulose et le ribose-2-phosphate, qui ne diffèrent du ribose et du désoxyribose que par la structure des substituants sur le carbone 2, ne sont pas phosphorylés par cet enzyme.

La majeure partie de travaux récents portant sur les acides nucléiques touche au problème du comportement et au rôle métabolique du désoxyribose-5-phosphate. On trouve dans différentes cellules des enzymes hydrolysant ou catalysant la synthèse des désoxyribonucléotides (21, 22, 23, 11) mais il y a relativement peu de travaux étudiant le métabolisme du désoxyribose-5-phosphate, ce problème ne pouvant être attaqué jusqu'à maintenant que par des méthodes indirectes, le désoxyribose-5-phosphate n'étant pas accessible. En ce qui concerne les réactions de ce sucre dans l'organisme, on sait que le désoxyribose-5-phosphate peut être dégradé selon le

mécanisme de RACKER (15, 16) en glycéraldéhyde phosphate et acétaldéhyde, soit, selon DOMAGK et HORECKER (24) en acétaldéhyde et acide lactique. Probablement toutes les transformations enzymatiques du désoxyribose passent par l'intermédiaire du phosphate de ce glucide.

Il est connu depuis les travaux de LEVENE et ses collaborateurs (2) que, dans les nucléotides, l'acide phosphorique est lié au sucre. Cependant c'est seulement en 1951 que LAMPEN et MANSON (21) ont trouvé dans les cultures de *E. coli* un enzyme catalysant l'hydrolyse des désoxyribonucléotides pour donner la base libre et un phosphate du désoxyribose. Dans une série de travaux consacrés à l'étude de cette réaction LAMPEN et ses collaborateurs (11,21,23) n'ont cependant jamais pu isoler le désoxyribose phosphate à l'état pur. Pour en établir la structure ils ont utilisé une solution contenant environs 10 micromoles du sucre; ils ont déterminé le phosphate organique, le pouvoir réducteur et le désoxyribose par des réactions colorées. La position du résidu phosphorique a été assignée au carbone 5 du sucre à la suite d'oxydation par le periodate et étude des produits d'oxydation.

Récemment des conditions d'hydrolyse des désoxynucléotides, permettant d'obtenir le désoxyribose-5-phosphate, ont été trouvées. Par exemple KORNBERG et al. (13) ont chauffé une solution faiblement acidifiée de désoxyadénosine-5'-phosphate pendant 5 minutes à 100° et séparé les produits d'hydrolyse sur une colonne de résine échangeuse d'ions, obtenant une solution contenant le désoxyribose-5-phosphate comme seul phosphate de sucre. Pareillement, JANSEN, LALAND et STRAND (22) ont utilisé pour cette hydrolyse une résine acide et ont séparé les produits à l'aide de chromatographie sur papier. Cependant, aucun groupe de chercheurs n'a isolé le produit. Par ailleurs, le désoxyadénosine-5'-phosphate étant un produit difficilement accessible, cette méthode ne convient guère comme méthode préparative pour le désoxyribose-5-phosphate.

RACKER dans le travail déjà cité (16) a décrit, pour la première fois, l'isolement du désoxyribose-5-phosphate sous forme de sel de baryum. Pour obtenir le corps analytiquement pur il l'a purifié par la chromatographie sur papier, ce qui limite évidemment les quantités accessibles du produit.

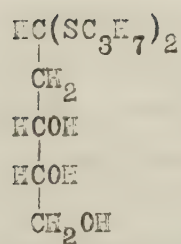
En 1958, DOMAGK et HORECKER (24) ont isolé parmi les produits d'une réaction enzymatique, catalysée par des extraits de *Lactobacillus plantarum*, le sel de baryum du désoxyribose-5-phosphate. Ils ont utilisé comme seul moyen de contrôle de pureté du produit le réactif de diphénylamine de DISCHE, et n'ont trouvé que 40-60% de désoxyribose dans la préparation.

Malgré l'intérêt que représente le 2-désoxy-D-ribose-5-phosphate pour les recherches biochimiques, le nombre de publications consacrées à l'étude de sa synthèse chimique n'est pas grand. Ceci s'explique par le fait que le D-désoxyribose lui-même est un glucide très difficile à obtenir en quantité. Puisque l'isomère L est beaucoup plus facilement accessible, ALLERTON, OVEREND et STACEY (25) ont décrit la synthèse du 2-désoxy-L-ribose-5-phosphate déjà en 1952. Comme matière première ils ont utilisé le méthyl 2-désoxy-L-ribofuranoside dont le groupe alcoolique primaire, situé sur le carbone 5 a été esterifié sélectivement par le diphénylphosphorochloridate. Le produit de la réaction donne, après hydrogénation catalytique et hydrolyse acide du groupement glycosidique, le 2-désoxy-L-ribose-5-phosphate, isolé sous forme de sel de plomb. Il est à remarquer que ces auteurs n'ont jamais donné les détails de leur travail: leur communication préliminaire, apparue en 1952, n'est pas suivie d'une publication précisant les conditions de la synthèse du 2-désoxy-L-ribose-5-phosphate. Le problème de la synthèse des phosphates du 2-désoxy-D-ribose n'a pu être résolu qu'après avoir vaincu les difficultés de l'obtention du sucre non phosphorylé.

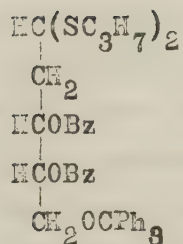
En 1954, KENNER et RICHARDS (26, 27) ont trouvé la voie qui a permis d'éliminer tous les inconvénients des synthèses élaborées jusqu'alors. Ils ont démontré que les hexoses substitués en position 3 par différents radicaux comme alcoyl, sulfonyl, glucidyl etc., donnent, après traitement alcalin, un mélange d'acides α et β métrasacchariniques. Ainsi le glucose substitué en 3, fournit un mélange des acides 3-désoxy-gluconique et 3-désoxy-mannonique, ce mélange pouvant être dégradé par la méthode de RUFF (28) pour donner le 2-désoxy-D-ribose. Après la description de cette suite de réactions plusieurs travaux ont apparu décrivant des modifications ou simplifications préparatives de cette méthode (29, 30, 31, 32).

Depuis la publication d'une Note, annonçant la réussite de notre synthèse du désoxyribose-5-phosphate (33), deux autres travaux ont été publiés décrivant des résultats de recherches sur le même sujet. Les deux synthèses utilisent le 2-désoxyribose partiellement protégé comme matière première.

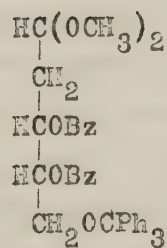
MacDONALD et FLETCHER (34) ont soumis le di-isopropylthioacétal du 2-désoxyribose (IV) à une tritylation suivie de benzylation et ont obtenu le di-isopropylthioacétal du 3,4-di-O-benzoyl-5-trityl-2-désoxyribose (V). Ce composé fut transformé en diméthylacétal correspondant (VI) et detritylé par hydrogénolyse en présence de palladium. Le diméthylacétal du 3,4-di-O-benzoyl-2-désoxyribose ainsi obtenu (VII) était phosphorylé par le diphénylphosphorochloridate pour donner le diméthylacétal du dibenzoyl-désoxyribose-5-diphénylphosphate (VIII). L'hydrogénation de ce produit en présence de platine suivie d'une hydrolyse alcaline a fourni le diméthylacétal du désoxyribose-5-phosphate (IX) dont le désoxyribose-5-phosphate fut libéré par hydrolyse acide. MacDONALD et FLETCHER n'ont pas isolé le produit de cette hydrolyse. Ils se sont contentés d'avoir démontré sur un chromatogramme la présence du sucre libre à côté d'un autre produit de cette réaction qui était probablement le méthyl 2-désoxyriboside-5-phosphate (XI).



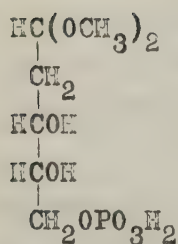
IV



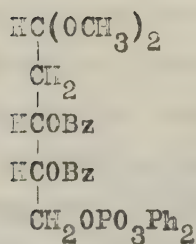
V



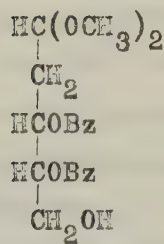
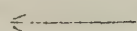
VI



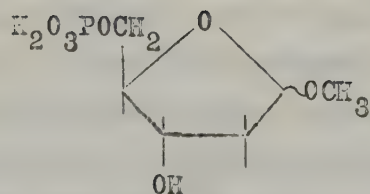
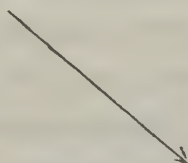
IX



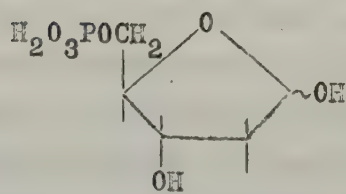
VIII



VII

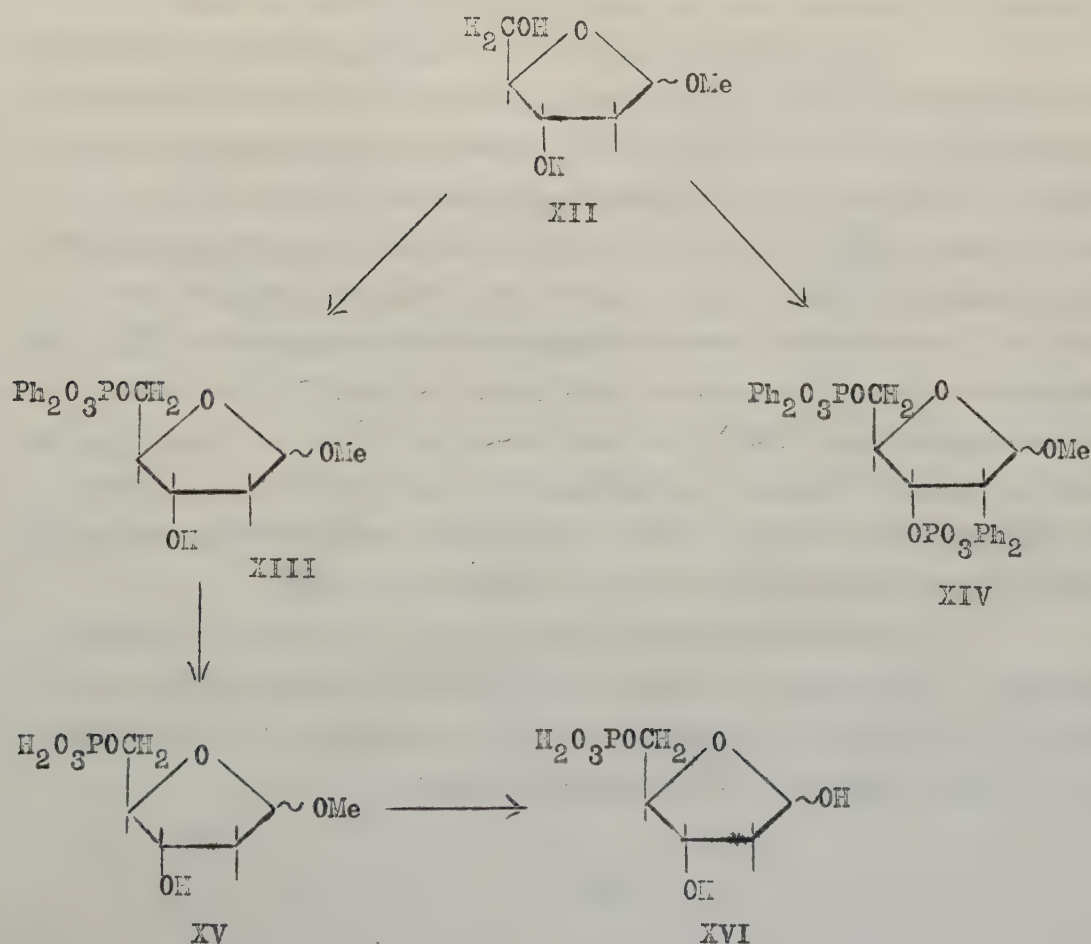


XI



X

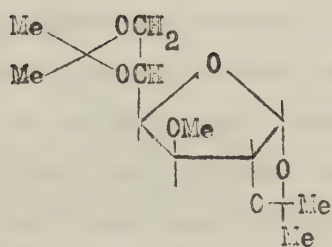
Indépendamment de ce travail, vers la fin de l'année 1959 UKITA et NAGASAWA (35) ont publié une autre synthèse du 2-désoxy-D-ribose-5-phosphate. Ils ont phosphorylé un mélange des méthyl 2-désoxy-D-ribofuranosides (XII) avec le diphénylphosphorochloridate et obtenu un mélange composé de méthyl 2-désoxy-ribofuranoside-5-diphényl phosphate (XIII) et le 3,5-bis-diphényl phosphate correspondant (XIV). Après avoir enlevé les groupes phényles par hydrogénolyse catalytique, les auteurs ont séparé le méthyl désoxyriboside-5-phosphate (XV) du 3,5-diphosphate par chromatographie sur colonne de cellulose et hydrolysé le monophosphate pour obtenir le 2-désoxy-D-ribose-5-phosphate (XVI).



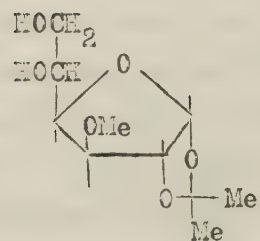
La voie de la synthèse du désoxyribose-5-phosphate que nous avons choisie suit plus directement les réactions découvertes par KENNER et RICHARDS. Connaissant la dégradation alcaline oxydative du fructose-6-phosphate (36, 37), ainsi que l'oxydation du glucose-6-phosphate en acide gluconique-6-phosphate (38), deux réactions dans lesquelles une transformation assez violente de la chaîne carbonée du sucre ne provoque ni l'hydrolyse, ni la cyclisation, ni la migration du résidu phosphorique, nous avons espéré que la transformation du glucose-6-phosphate substitué en 3, dans les conditions préconisées par KENNER et RICHARDS pourra être effectuée et donner le mélange des acides α et β métasacchariniques, dont la dégradation selon RUFF fournira le désoxyribose-5-phosphate. Les résultats de notre travail ont confirmé ce raisonnement. La suite des réactions qui nous a amenés au désoxyribose-5-phosphate se trouve représentée sur la page 11. Elle fut la suivante:

Par hydrolyse partielle du 1,2;5,6-diisopropylidène-3-méthyl-glucose (XVII), nous avons préparé le 1,2-isopropylidène-3-méthyl-glucose (XVIII) qui a été soumis à une phosphorylation sélective, effectuée par le diphénylphosphorochloridate. Cette réaction nous a fourni le 1,2-isopropylidène-3-méthyl-glucose-6-diphénylphosphate (XIX) lequel, après hydrogénolyse catalytique, a donné le 1,2-isopropylidène-3-méthyl-glucose-6-phosphate (XX). Par hydrolyse acide de ce composé nous avons préparé le 3-méthyl-glucose-6-phosphate (XXI). Le traitement de cette substance par la baryte a permis d'obtenir un mélange des acides α et β gluco-métasacchariniques (XXII) qui a été dégradé selon RUFF, donnant le 2-désoxyribose-5-phosphate avec un rendement de 20%.

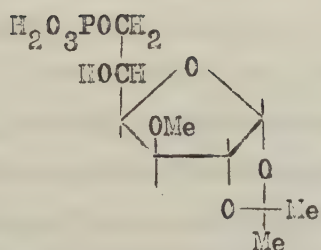
Disposant ainsi de près de 1 g. de désoxyribose-5-phosphate, nous avons pu établir ses propriétés physiques et chimiques et étudier son comportement envers quelques réactifs souvent utilisés dans les travaux biochimiques.



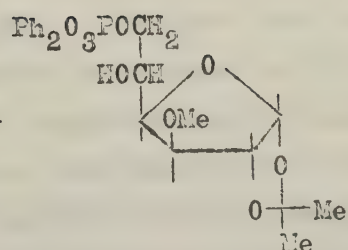
XVII



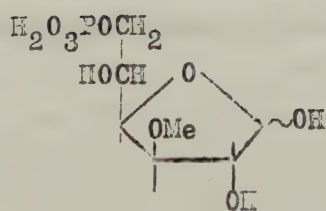
XVIII



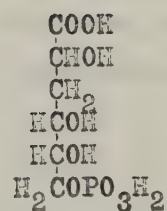
XX



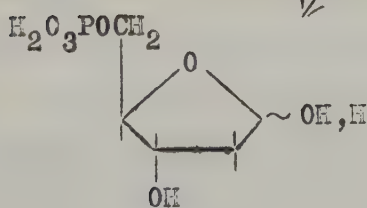
XIX



XXI

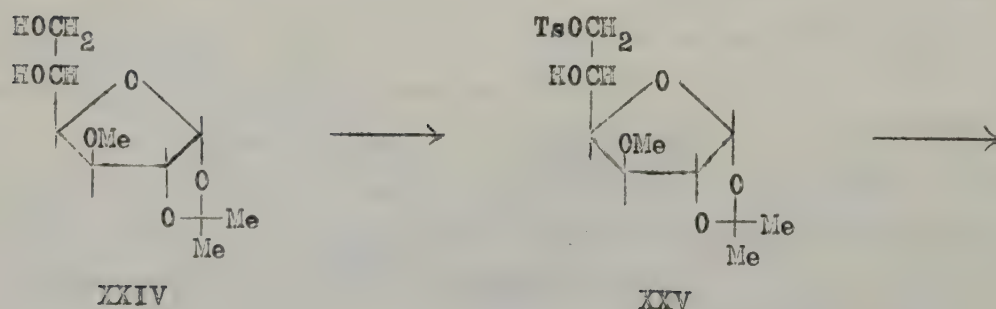


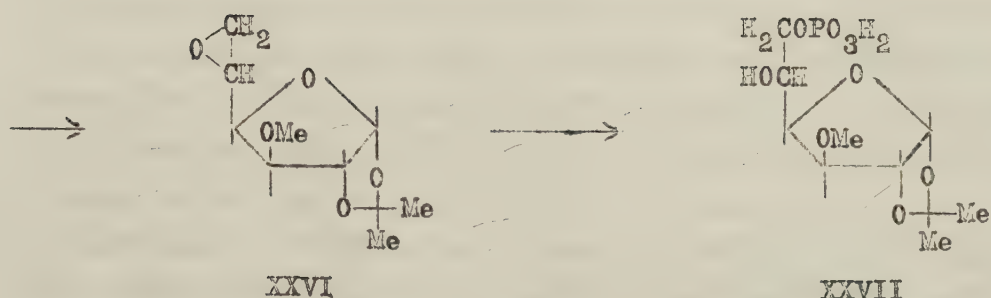
XXII



XXIII

Intermédiaire de la synthèse du 2-désoxyribose-5-phosphate, le 1,2-isopropylidène-3-méthyl-glucose-6-diphényl-phosphate (XIX) est un triester de l'acide phosphorique, dont la molécule possède, sur le carbone voisin du résidu phosphorique, un groupe hydroxyle libre. Considérant la possibilité d'une cyclisation de ce composé, réaction qui pouvait ensuite provoquer la migration du groupe phosphate, nous avons aussi élaboré une autre synthèse indépendante du 3-méthyl-glucose-6-phosphate. Cette deuxième suite de réactions, évitant l'ester phosphorique tertiaire, a permis d'obtenir un produit pur, dont la constitution est sans équivoque. Nous avons fait réagir le 1,2-isopropylidène-3-méthyl-glucose (XXIV) avec le chlorure de l'acide p-toluènesulfonique pour obtenir le 1,2-isopropylidène-3-méthyl-6-tosyl-glucose (XXV). Ce composé a été transformé en 1,2-isopropylidène-3-méthyl-5,6-anhydro-glucose (XXVI) lequel, après un traitement avec le phosphate de potassium a fourni le 1,2-isopropylidène-3-méthyl-glucose-6-phosphate (XXVII). Ce dernier corps était soumis aux mêmes transformations que le 1,2-isopropylidène-3-méthyl-glucose-6-phosphate préparé par la route décrite précédemment. La comparaison des produits obtenus par les deux méthodes différentes nous a permis d'établir leur identité.





Outre le produit principal, l'intermédiaire le plus important de cette synthèse, l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate, nous semblait également être une substance d'un certain intérêt. En effet, cet acide aldonique phosphorylé facilement accessible, peut être aussi utilisé pour obtenir une autre substance de grande importance biochimique: l'acide 2-céto-3-désoxy-gluconique-6-phosphate. Cet acide phosphorylé a été postulé par DOUDOROFF (39) déjà en 1952, comme intermédiaire dans la dégradation oxydative du glucose par le "hexose monophosphate shunt". L'acide 2-céto-3-désoxy-gluconique-6-phosphate est le premier membre découvert d'un groupe important de métabolites glucidiques, les acides 2-céto-3-désoxy-aldoniques phosphorylés sur l'atome terminal de la chaîne carbonée. La structure de l'acide 2-céto-3-désoxy-gluconique-6-phosphate a été établie en 1954 (40) après son isolement à l'état cristallin comme sel de sodium à partir de cultures microbiennes. Le 6-phosphogluconate déshydrase, enzyme qui catalyse la transformation du 6-phosphogluconate en 2-céto-3-désoxy-gluconate-6-phosphate et le 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate aldolase, un autre enzyme qui provoque la fragmentation de l'acide 2-céto-3-désoxy-6-phospho-gluconique en glycéraldéhyde phosphate et acide pyruvique ont été récemment isolés et décrits (41,42). D'autres acides 2-céto-

3-désoxy-aldoniques phosphorylés, comme le 2-céto-3-désoxy-galactonate-6-phosphate et le 2-céto-3-désoxy-octonate-8-phosphate sont maintenant aussi connus (43,44). Le 2-céto-3-désoxy-arabonate et le 2-céto-3-désoxy-heptonate ont été isolé comme substances ne contenant pas de phosphate (45, 46, 47) mais dans les cellules vivantes ils existent probablement comme esters phosphoriques.

L'oxydation des acides aldoniques par le chlorate en présence d'oxyde vanadique produit, selon REGNA et CALDWELL (43) la transformation sélective du OH sur le carbone 2 de l'acide en groupe carbonyle. L'application de cette méthode à l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate devrait . fournir l'acide 2-céto-3-désoxy-gluconique-6-phosphate de DOUDOROFF. En effet, le mélange réactionnel, obtenu après le traitement de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate par le chlorate et V_2O_5 , contient la substance cherchée, ce que nous avons établi en le comparant sur chromatogrammes avec l'acide 2-céto-3-désoxy-gluconique-6-phosphate authentique, reçu du Professeur DOUDOROFF.

D'après nos essais, le problème de trouver les conditions pour obtenir des rendements satisfaisants et pour isoler le produit pur exige des études spéciales qui n'ont point trouvé de place dans ce travail.

En vue de l'intérêt que présente l'approfondissement des études sur l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate, nous avons élaboré une autre voie de synthèse pour ce corps. BROWN, HAYES et TODD (49) ayant démontré la formation de l'acide glucométasaccharinique par traitement alcalin du glucose-3-phosphate, il nous semblait probable que le glucose-3,6-phosphate cyclique donnerait, dans les mêmes conditions l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate. Le glucose-3,6-phosphate cyclique étant un produit relativement facilement accessible, la transformation de cette substance en acide glucométasaccharinique-6-phosphate faciliterait la préparation du désoxyribose-5-phosphate et les études de la synthèse de l'acide 2-céto-3-désoxy-gluconique-6-phosphate.

Le traitement alcalin du glucose-3,6-phosphate cyclique nous a fourni l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate, identique avec le produit de la dégradation du 3-méthyl-glucose-6-phosphate. Par dégradation du glucose-3,5-phosphate cyclique nous avons préparé l'acide glucométasaccharinique-5-phosphate, dont les réactions permettent de le distinguer du 6-phosphate isomère.

Au cours des travaux sur les phosphates des acides glucométasacchariniques nous avons utilisé le titrage avec le periodate comme méthode analytique. Les résultats de ces titrages ne peuvent pas être expliqués par le schéma classique de l'oxydation periodique. Nos études sur ce sujet forment le thème d'un chapitre particulier de cette Thèse.

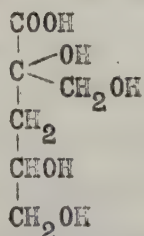
CHAPITRE I.

Synthèse de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate à partir de 3-méthyl-glucose.

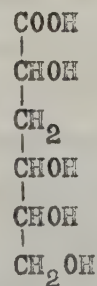
La formation d'un acide carboxylique pendant le traitement du glucose par la chaux a été décrit, pour la première fois, par PELIGOT en 1838 (50). Il a isolé une lactone cristalline qu'il nomma "saccharine". Après les travaux de SCHEIBLER (51), qui a reconnu la nature lactonique de la saccharine, le nom traditionnel d'acides sacchariniques est entré dans le langage courant pour désigner les acides aldoniques isomères de l'aldose dont ils sont formés. Les études approfondies de la structure des produits de la dégradation alcaline des hexoses ont établi (en dehors de l'acide lactique formé simultanément) la présence de trois différents acides aldoniques isomères (52,53): l'acide saccharinique (XXVIII), l'acide isosaccharinique (XXIX) et l'acide métasaccharinique (XXX).



XXVIII



XXIX



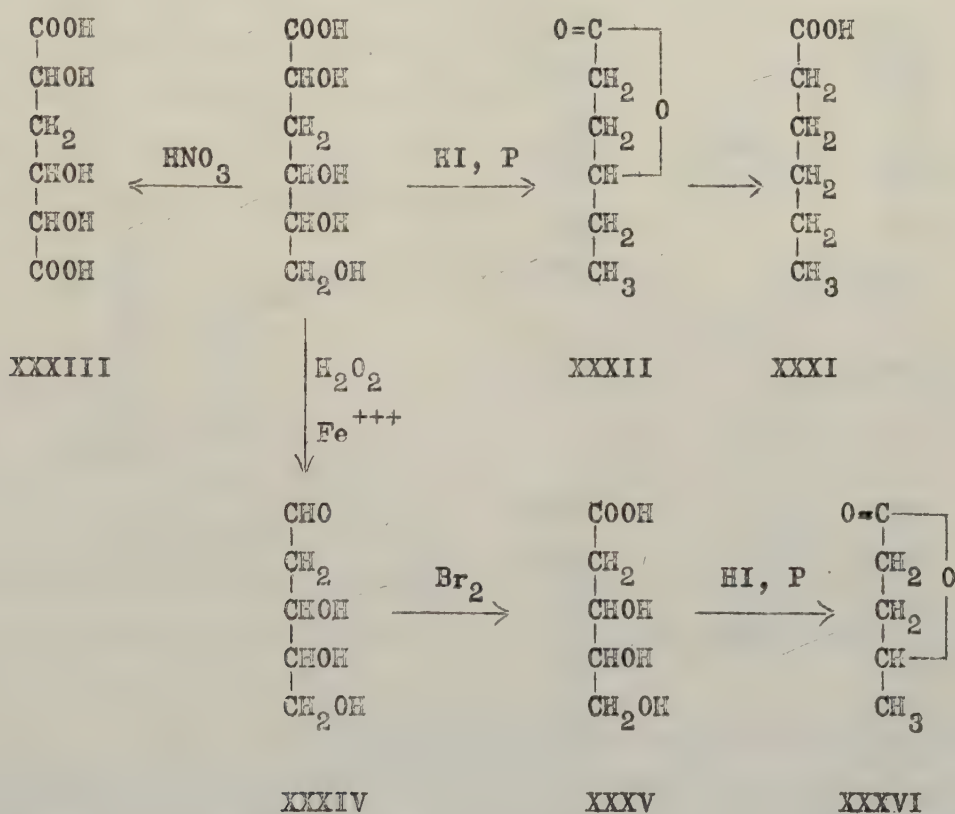
XXX

C'est KILIANI qui, en 1883, a le premier isolé un acide métasaccharinique à partir du mélange de produits obtenu par la dégradation alcaline du lactose (54). Le même acide galactométasaccharinique était aussi formé comme produit mineur pendant le traitement alcalin du galactose (55).

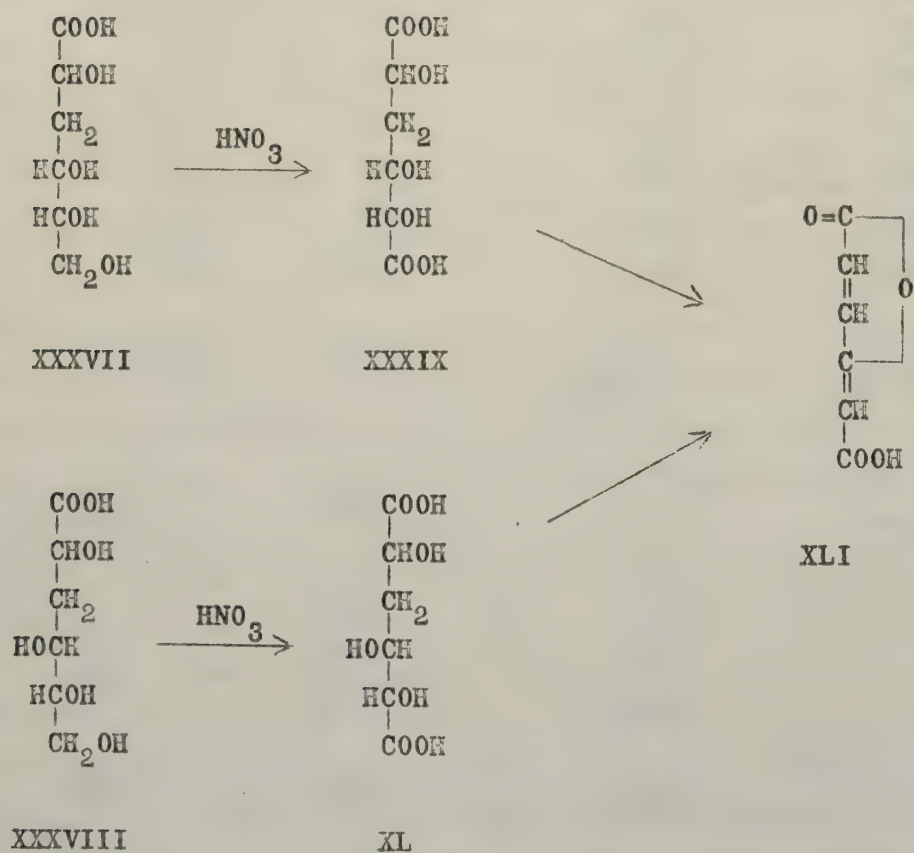
L'acide glucométasaccharinique était, pour la première fois, obtenu par NEF, par traitement du glucose avec de la soude concentrée à chaud (56). Récemment on a découvert que l'on pouvait plus avantageusement obtenir cet acide par traitement alcalin de la laminarine (57) ou encore par dégradation alcaline de dérivés du glucose substitués sur l'oxygène du troisième atome de carbone (26, 58, 59).

Les acides métasacchariniques étant des corps isomères des aldoses, doivent posséder un groupe $-CH_2-$ à la place d'un groupe $-CHOH-$ dans leur molécule. C'est pourquoi, après avoir établi que la chaîne carbonée de ces composés n'était pas ramifiée, il ne restait plus qu'à trouver le carbone dépourvu d'oxygène. L'acide galactométasaccharinique était le premier acide métasaccharinique dont la structure fût établie. KILIANI, ayant effectué la réduction de l'acide galactométasaccharinique avec l'acide iodhydrique, a trouvé (60) de l'acide hexanoïque(XXXI) et le lactone de l'acide 4-hydroxy-hexanoïque (XXXII). La formation du premier de ces deux corps indique une structure non-ramifiée de la chaîne carbonée. Le lactone de l'acide 4-hydroxy-hexanoïque confirme cette conclusion et témoigne de la présence d'un groupe hydroxyle sur le carbone 4 de la molécule de l'acide métasaccharinique. L'oxydation de l'acide métasaccharinique par l'acide nitrique a fourni un acide dicarboxylique à six atomes de carbone: l'acide trihydroxyadipique (XXXIII). Cette réaction démontre l'absence du groupement désoxy à l'extrémité de la chaîne des acides métasacchariniques. Le fait que les acides métasacchariniques peuvent être dégradés par la méthode de RUFF (61) donnant un pentose est la preuve de la présence d'un hydroxyle lié au carbone deux de l'acide soumis à la

dégradation. L'oxydation du désoxypentose ainsi préparé (XXXIV) par le brome fournit l'acide trihydroxyvalérique (XXXV) dont la réduction à l'aide de l'acide iodhydrique donne la lactone de l'acide 4-hydroxyvalérique (XXXVI), connu. Puisque le carbone 4 du pentose (XXXIV) correspond au carbone 5 de l'acide galactométasaccharinique soumis à la dégradation de RUFF, cette suite de transformations démontre d'une façon sans équivoque la présence du groupement désoxy sur le carbone 3 des acides métasacchariniques.



NEF a établi que la structure de l'acide glucométasaccharinique (XXXVII) ressemble à celle de l'acide galactométasaccharinique (XXXVIII) (56). Il a démontré que les acides gluco- et galactométasacchariniques, traités par l'acide nitrique, fournissent deux acides trihydroxy-adipiques différents (XXXIX et XL). Ces deux acides donnent, après la déshydratation un seul lactone, celui de l'acide 3-hydroxy-muconique (XLI).



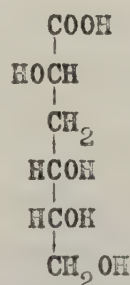
En prenant en considération l'origine des acides galacto- et glucométasacchariniques et les analogies de leurs pouvoirs rotatoires avec celles des hexoses dont ils sont formés, NEF a suggéré que la différence entre ces deux acides est de même nature que celle qui existe entre le galactose et le glucose: c'est à dire que l'acide

galactométasaccharinique et l'acide glucométasaccharinique ne diffèrent que par la configuration des substituants sur le carbone 4. Plus récemment, la préparation du 2-désoxy-D-ribose par la dégradation de l'acide glucométasaccharinique selon la méthode de RUFF (29,30), a pleinement confirmé l'hypothèse de NEF.

L'acide glucométasaccharinique peut être séparé en deux isomères nommés acides α et β glucométasacchariniques. A cause du pouvoir rotatoire négatif du phénylhydrazide de l'épimère β , on a proposé pour celui-ci la configuration du mannose sur le carbone 2. Ceci a été confirmé par l'identité de son lactone avec le lactone de l'acide 3-désoxy-mannonique authentique (29). On peut donc exprimer les structures des acides α et β glucométasacchariniques par les formules suivantes:



acide α -D-glucométasaccharinique
acide 3-désoxygluconique

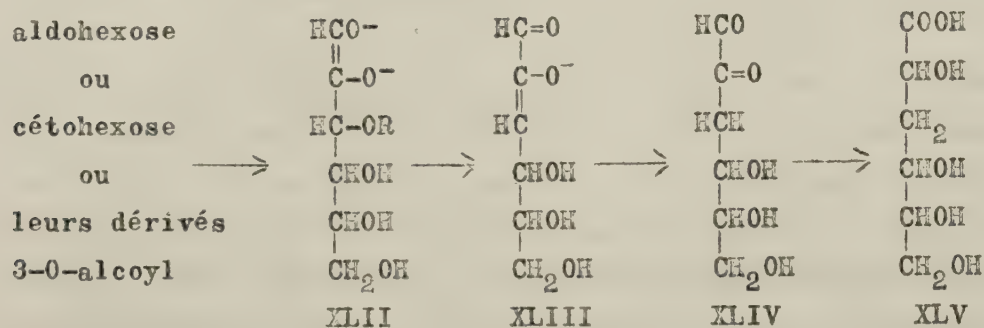


acide β -D-glucométasaccharinique
acide 3-désoxymannonique

En ce qui concerne le mécanisme de la formation des acides sacchariniques, KILIANI (55) a proposé une suite de réactions de rupture et de recombinaison des fragments de la chaîne carbonée. En 1907, NEF a proposé un mécanisme d'isomérisation due à l'influence du milieu basique. Ce mécanisme a été repris et modifié par ISBELL (62) et ensuite par KENNER (26).

Selon ces derniers, le premier stade de la dégradation est la formation et l'ionisation du 1,2-ènediol (XLII) qui peut aussi bien être produit à partir d'un aldose que d'une cétose. Cette transformation est suivie de l'élimination d'un groupe hydroxyle

ou alcoyloxy (glycoxy) en β , fournissant ainsi un ion du 3-désoxy-aldose 2,3-désaturé (XLIII). Cet ion étant la forme énolique d'un composé α -dicarbonyle (XLIV) subit une transformation du type de réarrangement de l'acide benzylique et donne un mélange des acides α et β métasacchariniques (XLV).



R = H, alcoyl
ou glycosyl

Au cours de cette suite de réactions, la liaison entre le carbone 3 et l'oxygène est rompue de telle manière que l'oxygène est éliminé avec les deux électrons formant cette liaison. Le substituant en 3 qui empêche l'ionisation de cet hydroxyle et qui possède un effet inductif négatif, facilite cette élimination. Cette hypothèse est pleinement confirmée par les rendements plus élevés d'acide métasaccharinique obtenus lors de la dégradation des aldoses substitués en 3 (26, 58, 59).

Synthèse de 3-méthyl-glucose-6-phosphate.

Le point de départ de cette synthèse a été le 1,2;5,6-diisopropylidène glucofuranose, préparé selon la méthode de GRUNENBERG, BERDT et FREUDENBERG (63) et soumis à une méthylation par le sulfate de méthyle selon GLEN et ses collaborateurs (64). Nous avons ainsi obtenu le 1,2;5,6-diisopropylidène-3-méthyl-glucose (XVII). Il est bien connu que dans le cas des dérivés diacétonés d'un hexose, la vitesse d'hydrolyse acide des deux restes isopropylidènes n'est pas la même. Généralement le groupe lié avec le car-

bone hémiacétalique est beaucoup plus stable. Par exemple, dans le 1,2;5,6-diisopropylidène-glucofuranose le substituant en 5,6 est 40 fois plus rapidement hydrolysé que celui en 1,2 (65,66). Il existe également des composés où la différence de la vitesse d'hydrolyse n'est pas si grande, mais on peut presque toujours trouver des conditions permettant une hydrolyse partielle d'un diacétone-sucré. L'hydrolyse partielle du diacétone-3-méthylglucose, menant au 1,2-isopropylidène-3-méthyl-glucofuranose est décrite par IRVINE (67, 68). Elle a été effectuée par l'action de l'acide chlorhydrique en solution méthanolique. Selon notre expérience les rendements de cette hydrolyse ne dépassent pas 50% de la théorie. Parmi les produits se trouve, à côté du mono- et diacétone-3-méthyl-glucose, aussi le sucre complètement hydrolysé: le 3-méthyl-glucose. Le 1,2-isopropylidène-3-méthyl-glucose peut être distillé sous vide et c'est la meilleur méthode pour le purifier. Cependant, dans ces mêmes conditions le 3-méthyl-glucose est décomposé; donc s'il est présent dans le mélange réactionnel, le monoacétone-3-méthyl-glucose distillé sera toujours contaminé par les produits de la décomposition de ce sucre. Pour améliorer cette synthèse et pour obtenir un produit pur, nous avons effectué cette hydrolyse en utilisant l'acide acétique à 60% (69) et opéré à 38°. On ne trouve, alors, dans le mélange réactionnel que des quantités relativement petites de diacétone-3-méthyl-glucose et on peut isoler le monoacétone-3-méthyl-glucose (XVIII) avec un rendement de 70% par distillation directe du mélange.

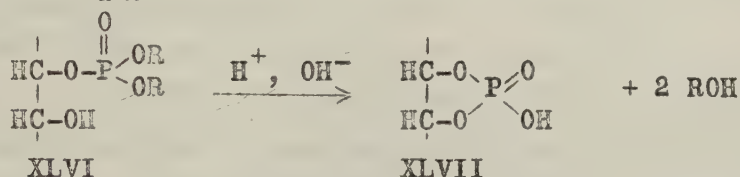
Pour la phosphorylation du 1,2-isopropylidène-3-méthyl-glucose, comme pour la préparation de plusieurs autres phosphates de glucides, nous avons utilisé le diphényl-phosphorochloridate. Cette substance - le chlorure d'un diester de l'acide phosphorique, a plusieurs avantages en comparaison avec les autres réactifs phosphorylants. Déjà en 1910 Emil FISCHER (70) avait effectué une phosphorylation du méthylglucoside en utilisant l'oxychlorure de phosphore. Ce réactif, dont l'usage est assez commode

est utilisé pour certaines synthèses même maintenant (71,72). Cependant l'utilisation de l'oxychlorure de phosphore a plusieurs inconvénients lorsqu'il s'agit de préparer des phosphates primaires des sucres. L'oxychlorure de phosphore donne facilement des phosphates secondaires: soit des esters contenant deux restes glucidiques, soit, dans le cas des sucres insuffisamment protégés, des phosphates cycliques. Parmi les chlorures des diesters de l'acide phosphorique le diphényl- et le dibenzyl-phosphorochloridates (73,74) sont généralement utilisés. Leur usage donne de meilleurs résultats dans les préparations des phosphates primaires des sucres et les radicaux phényle ou benzyle sont faciles à éliminer des produits primaires de la phosphorylation. Le diphénylphosphorochloridate est incomparablement plus stable que son dibenzyl analogue c'est pourquoi l'usage du premier est beaucoup plus aisé.

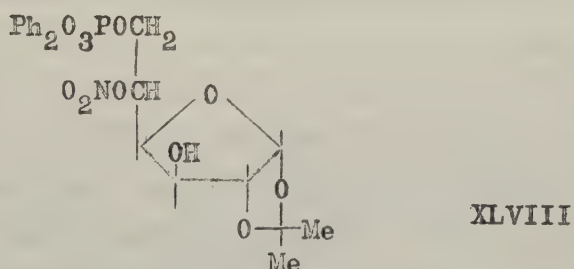
La phosphorylation par les chlorures de l'acide phosphorique nécessite la présence d'une base: la réaction est d'habitude effectuée en milieu pyridinique anhydre. Pour éviter la phosphorylation du groupe hydroxyle secondaire non protégé, nous avons utilisé seulement un très léger excès de l'agent phosphorylant. Nous avons contrôlé la marche de la phosphorylation à l'aide de la réaction avec le periodate: le 1,2-isopropylidène-3-méthyl-glucosufuranose possédant un groupement diol sur les carbones 5 et 6, réagit facilement avec le periodate, tandis que le produit phosphorylé ne donne plus cette réaction. On peut donc déterminer le temps nécessaire pour la phosphorylation, en examinant des échantillons du mélange réactionnel. L'absence de la réaction avec le periodate indique que la phosphorylation est terminée.

Cependant, l'isolement du produit par les méthodes habituellement utilisées, c'est-à-dire l'addition de chloroforme au mélange réactionnel et élimination de l'excès de pyridine, de l'agent phosphorylant et du glucide non phosphorylé par des lavages à l'eau, ne nous ont fourni la substance qu'avec des rendements de l'ordre de 3 à 5 pour cent.

A notre avis ce très mauvais rendement est dû à une transformation secondaire propre aux triesters de l'acide phosphorique. En effet, lorsqu'un triester de l'acide phosphorique se trouve vicinal d'un groupe hydroxyle dans la même molécule (XLVI), il subit une transesterification accompagnée d'une réaction d'élimination donnant un phosphate cyclique dont le cycle comporte cinq membres (XLVII). Cette transformation se manifeste surtout en présence d'eau.



L'absence de cette réaction avec un hydroxyle non vicinal est démontrée par la stabilité du 1,2-isopropylidène-glucose-5-nitrate-6-diphénylphosphate (XLVIII) dans les mêmes conditions (75).



Les phosphates cycliques à cinq chaînons s'hydrolysent facilement sous l'influence d'acides ou de bases (76,77,78). Dans le cas du 1,2-isopropylidène-3-méthyl-glucose-5,6-phosphate cyclique (XLVII), formé par la cyclisation du isopropylidène-3-méthylglucose-6-diphénylphosphate (XIX), le produit de cette hydrolyse contiendrait à côté du isopropylidène-3-méthylglucose-6-phosphate désiré (XX) aussi son isomère le 5-phosphate. Ce dernier peut suivre toutes les transformations du isopropylidène-3-méthylglucose-6-phosphate en contaminant les produits de la suite des réactions prévues.

Comme nous avons déjà mentionné, la cyclisation du 1,2-isopropylidène-3-méthylglucose-6-diphénylphosphate est catalysée aussi bien par les ions hydrogène que par les ions hydroxyle. Pour diminuer l'effet de ces ions, nous avons réalisé la phosphorylation du 1,2-isopropylidène-3-méthylglucose (XVIII) dans du benzène anhydre, solvant qui empêche la dissociation du chlorhydrate de pyridinium formé pendant la réaction. Par surcroît, l'usage du benzène permet d'éliminer à la fin de la réaction, presque quantitativement, le chlorhydrate de pyridinium insoluble dans ce solvant. La phosphorylation d'un alcool à l'aide d'un chlorure de l'acide phosphorique nécessite la présence d'une base: nous avons utilisé à cette fin la pyridine anhydre. Pour les raisons décrites ci-dessus, nous avons considéré l'excès de pyridine comme préjudiciable et nous en avons utilisé aussi peu que possible. Une étude systématique a démontré que la réaction exigeait, pour avoir lieu avec des rendements raisonnables, au moins 3 moles de pyridine pour un mole de sucre. Cet excès de pyridine, la partie du chlorhydrate de pyridinium restée en solution ainsi que l'excès du diphénylphosphorochloridate ont été éliminés du mélange réactionnel à l'aide de résines échangeuses d'ions, utilisées également en milieu benzénique. Nous avons pu éliminer toute la pyridine en faisant traverser la solution obtenue après la phosphorylation, par une colonne d'Amberlite IR 120 sous sa forme acide. L'élimination des produits acides a rencontré quelques difficultés, dues à l'instabilité des résines basiques en forme de base libre dans le milieu benzénique anhydre. Nous étions donc obligés de faire passer la solution, après la résine basique, encore une fois par la colonne de IR 120 pour éliminer les produits de la décomposition de la résine basique. Dans quelques préparations nous avons éliminé le passage par la résine basique et purifié seulement le produit final, ce qui n'a pas eu une grande influence sur les rendements du 3-méthylglucose-6-phosphate (XXI).

Nous avons réalisé l'élimination des groupes phényles du 1,2-isopropylidène-3-méthyl-glucose-6-diphénylphosphate (XIX) par hydrogénolyse en solution éthanolique en présence de platine d'Adams. Sans isoler le 1,2-isopropylidène-3-méthyl-glucose-6-phosphate (XX) formé, nous l'avons soumis à l'hydrolyse acide en utilisant l'acidité propre du phosphate de sucre. Le 3-méthyl-glucose-6-phosphate (XXI) ainsi obtenu a été isolé comme sel de baryum. Pour l'analyse nous avons aussi préparé le sel de cyclohexylammonium.

La structure de cette substance a été confirmée par les réactions typiques des aldoses, comme la réduction des réactifs de Fehling, de Benedict et du phthalate d'aniline. Le titrage avec le periodate de sodium montre la consommation très rapide d'un équivalent de ce réactif suivie de celle, plus lente, d'un deuxième équivalent. La présence d'un ester primaire de l'acide phosphorique est démontrée par titrage électrométrique révélant deux dissociations acides.

La synthèse du 3-méthyl-glucose-6-phosphate que nous venons de décrire et qui donne un produit dont l'analyse élémentaire et les réactions sont conformes à la théorie, n'est cependant pas sans équivoque en raison des réactions secondaires que nous avons mentionnées.

Pour nous assurer que la synthèse décrite précédemment nous a fourni du 3-méthyl-glucose-6-phosphate pur, nous avons préparé ce phosphate de sucre par une autre route, qui, avec des rendements moins élevés, devait donner le même produit à l'état pur.

Comme substance de départ pour cette deuxième synthèse nous avons également utilisé le 1,2-isopropylidène-3-méthyl-glucose (XXIV), dont la synthèse est décrite dans la première partie de ce chapitre. Ce composé a été transformé en son dérivé 6-p-toluènesulfonylé (XXV) par l'action du chlorure de l'acide p-toluènesulfonique (59). Depuis les travaux de OHLE (79,80,81) il

est connu que les esters p-toluènesulfoniques des glucides, possédant un groupe alcoolique voisin libre, peuvent être transformés en dérivés époxy par traitement alcalin. Utilisant cette méthode nous avons préparé le 1,2-isopropylidène-3-méthyl-5,6-anhydro-glucose (XXVI) par traitement du 1,2-isopropylidène-3-méthyl-6-tosyl-glucose avec un équivalent de méthylate de sodium. Le produit ainsi obtenu a les mêmes constantes physiques que le produit obtenu par méthylation du 1,2-isopropylidène-5,6-anhydro-glucose (59).

De nombreux exemples de rupture du cycle époxyde des dérivés du 5,6-anhydro-glucose sont connus. Dans tous les cas l'anion du réactif provoquant cette ouverture se fixe sur le carbone terminal de la chaîne carbonée. Ainsi, l'action de l'ammoniac sur le 5,6-anhydroglucose provoque la formation du 6-amino-glucose (80); les amines primaires et secondaires, aliphatiques ou aromatiques donnent des 6-alcoylamino- ou 6-arylamino-glucoses (82,83,84); des 6-alcoxyglucoses sont produits par la réaction du 5,6-anhydro-glucose avec les alcoolates (80,81) et les acides carboxyliques donnent du glucose esterifié en 6 (85). Pour préparer les esters des acides minéraux la réaction doit être effectuée soit en présence de pyridine soit par un sel basique de l'acide (85). A notre connaissance il n'est connu qu'un seul exemple de préparation d'un ester phosphorique par cette méthode: LAMPSON et LARDY (86), faisant réagir le 1,2-isopropylidène-5,6-anhydro-glucose avec le phosphate bipotassique, ont obtenu le 1,2-isopropylidène-glucose-6-phosphate. Selon ces auteurs cette réaction demande un chauffage de 24 heures à 100°.

Pour transformer le 1,2-isopropylidène-3-méthyl-5,6-anhydro-glucofuranose (XXVI) en 1,2-isopropylidène-3-méthyl-glucose-6-phosphate (XXVII) nous avons chauffé la substance de départ avec une solution saturée de deux moles de phosphate bipotassique, le progrès de la réaction étant contrôlé par chromatographie sur papier. Nous avons pu déterminer par cette méthode que le temps

nécessaire pour ouvrir le cycle époxyde du 1,2-isopropylidène-3-méthyl-5,6-anhydro-glucose est de 8 heures. Nous avons observé qu'il se forme, à côté du produit phosphorylé, aussi une autre substance ayant des valeurs Rf plus élevées et réagissant avec le periodate: elle est probablement le 1,2-isopropylidène-3-méthyl-glucose formé par hydrolyse de l'anhydrosucre. Nous avons éliminé les ions potassium du mélange réactionnel à l'aide de résine acide IR 120. Le phosphate inorganique était ensuite précipité par de la baryte et le sel de baryum amorphe du 1,2-isopropylidène-3-méthyl-glucose-6-phosphate isolé par concentration de la solution à sec. Le sel de baryum ainsi obtenu est débarrassé des dérivés glucidiques par lavage à l'éther et transformé en sel de cyclohexylammonium cristallin.

L'hydrolyse acide du 1,2-isopropylidène-3-méthyl-glucose-6-phosphate (XXVII) a fourni le 3-méthyl-glucose-6-phosphate, isolé sous forme de sel de baryum. La comparaison de cette substance avec le composé (XXI), obtenu par phosphorylation sélective du 1,2-isopropylidène-3-méthyl-glucose, confirma l'identité des deux corps. Par conséquent la structure (XXI) est correctement assigné à la substance synthétisée par phosphorylation sélective. Nous avons aussi comparé les acides glucométasaccharinique-6-phosphates (XXII) préparés par dégradation alcaline des 3-méthyl-glucose-6-phosphates obtenus par ces deux voies différentes. L'identité des acides obtenus prouve également l'identité des produits synthétisés par les deux voies.

Dégradation alcaline du 3-méthyl-glucose-6-phosphate.

Comme nous avons vu, la transformation des oses en acides sacchariniques exige un milieu fortement alcalin, qui rend possible l'ionisation du sucre et ensuite l'élimination d'un oxygène et le réarrangement de la structure. Pour effectuer cette réaction lors des premiers essais, on a utilisé des bases fortes à

des concentrations assez élevées. NEF a dégradé les glucides par la soude 8 N à chaud (56), PELIGOT (50), SCHEIBLER (51.), KILIANI (54, 55, 60) et d'autres avaient effectué ces dégradations à l'aide de solutions saturées de chaux ou de baryte à la température ambiante. KENNER et RICHARDS (26, 27) dans leurs études sur le mécanisme et les conditions de la dégradation des oses substitués en 3, ont établi que la réaction a lieu déjà avec des bases diluées. Pour préparer l'acide glucométasaccharinique ils ont traité le 3-méthylglucose par une solution diluée de chaux.

Nos expériences préliminaires ont démontré que le produit formé lors du traitement alcalin du 3-méthylglucose-6-phosphate donne facilement un sel de baryum cristallin. Nous avons donc cherché à effectuer cette dégradation par la baryte dans des conditions permettant l'isolement immédiat du sel de baryum de l'acide formé. Pour nous assurer qu'avec la baryte on peut obtenir le même résultat qu'avec la chaux, nous avons répété la préparation de KENNER et RICHARDS en remplaçant la chaux par la baryte et nous avons obtenu, avec un rendement identique, le même produit. Nous avons également constaté que la dégradation du 3-méthylglucose phosphorylé peut être aussi bien réalisée à l'aide de baryte par traitement prolongé à la température ambiante que par chauffage en présence de la même base pendant une heure sur le bain-marie bouillant. Cependant, pour toutes nos dégradations nous avons utilisé le premier mode opératoire (à froid), car il nous semblait être moins à craindre du point de vue de la stabilité du résidu phosphorique. La dégradation alcaline des oses exige un excès assez grand de base minérale pour assurer l'ionisation de la molécule: condition essentielle de la réaction. Dans nos préparations nous avons utilisé environ trois équivalents de baryte par mole de sucre. La réaction terminée, l'élimination de cet excès de base était effectuée à l'aide de résine Amberlite IR 120. Nos essais pour parvenir au même but, en précipitant les ions de baryum sous forme de carbonate, n'ont pas donné les résultats attendus: le rendement du produit de

la dégradation baisse fortement à cause d'adsorption à la surface du carbonate de baryum. La solution obtenue après le traitement alcalin du 3-méthyl-glucose-6-phosphate et l'élimination de la baryte en excès est ajustée à pH 8 et concentrée: le sel de baryum de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate cristallise spontanément comme dihydrate.

Les chromatogrammes de l'acide libre, développés dans un solvant pyridinique, montrent la présence de deux taches pouvant être révélées par le réactif spécifique des esters phosphoriques. Le rapport de l'intensité de ces deux tâches dépend visiblement de la période de temps durant laquelle la substance reste en milieu acide avant d'être déposée sur le papier. A l'aide de la réaction classique d'hydroxylamine et ions ferriques nous avons établi que la substance ayant des valeurs de R_f plus élevées est le lactone de l'acide glucométasaccharinique phosphorylé qui lui même migre plus lentement sur le papier. Une observation analogue a été décrite en 1952 par MASAMUNA et MAKI (87), qui ont séparé l'acide glucuronique de son lactone à l'aide de chromatographie sur papier dans un solvant pyridinique.

Pour confirmer la structure de la chaîne carbonée du produit de la dégradation alcaline du 3-méthyl-glucose-6-phosphate, nous avons soumis ce produit à la déphosphorylation enzymatique effectuée par la phosphatase acide de blé et établi l'identité du produit avec l'acide glucométasaccharinique authentique (26).

Les trois fonctions acides de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate sont très difficiles à mettre en évidence à l'aide de titrage potentiométrique. La vitesse de la formation réversible du lactone se reflète dans les courbes de ce titrage qui devient très difficile à interpréter. Cependant nous avons obtenu de résultats satisfaisants par titrage conductimétrique; nous avons pu, alors, démontrer la présence de trois dissociations acides dans la molécule de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate.

Le titrage de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate par le periodate indique une consommation immédiate d'un équivalent de ce réactif. Ce résultat confirme la structure de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate, dont la molécule renferme un diol vicinal. Cependant, nous avons observé une "suroxydation" de cette substance par le periodate: nous traiterons ce problème dans le quatrième chapitre de ce travail.

L'acide glucométasaccharinique-6-phosphate obtenu par la dégradation du 3-méthyl-glucose-6-phosphate, est un mélange des isomères α et β . Dans une des préparations, grâce à une cristallisation spontanée de l'un des isomères, nous avons réussi à isoler séparément ces acides épimères. Suivant le raisonnement de NEF (56) nous avons assigné la configuration stérique du carbone 2 des deux acides à la suite de la détermination de leurs pouvoirs rotatoires. Ainsi, nous avons défini l'isomère ayant le pouvoir rotatoire positif comme étant l'acide 3-désoxygluconique-6-phosphate (isomère α); la structure de l'acide 3-désoxymannonique-6-phosphate (isomère β) est attribuée à l'isomère de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate ayant un pouvoir rotatoire négatif.

Disposant ainsi des épimères de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate nous avons pu déterminer leurs rangs d'élution d'une colonne analytique de résine échangeuse d'ions. Bien que les épimères, chromatographiés séparément, émergent de la colonne à des volumes différents d'effluent, le mélange n'a pu être complètement résolu sur la colonne utilisée. La séparation pourra cependant être effectuée sur des colonnes très longues.

Nous avons essayé de confirmer la présence d'un groupe carboxyle dans l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate par la préparation du lactone correspondant. Nous avons observé que le radical phosphoryle n'est pas hydrolysé pendant le traitement acide provoquant la lactonisation, mais nos efforts pour cristalliser et purifier le lactone formé n'ont pas donné de résultats. L'acide glucométasaccharinique-6-phosphate utilisé étant un mélange des iso-

mères α et β , chacun de ces isomères pouvant former deux lactones (γ et δ lactones), on obtient dans cette préparation un mélange de quatre substances ce qui explique les difficultés de cristallisation.

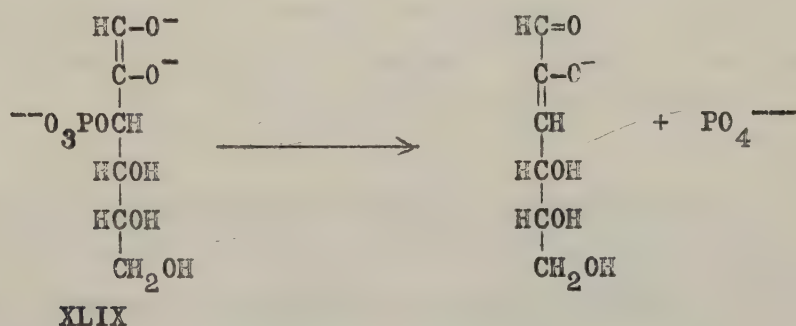
Cependant nous avons réussi à préparer un autre dérivé de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate. En effet, la réaction du lactone avec de l'aniline dans des conditions déterminées par GREEN (88,89) pour la préparation des anilides de l'acide glucométasaccharinique non phosphorylé, nous a fourni un anilide cristallin, isolé sous forme de sel d'anilinium, dont la structure a été confirmée par analyse élémentaire. Nous ignorons si la substance obtenue lors de cette réaction est un corps homogène ou bien un mélange d'anilides des acides α et β glucométasaccharinique-6-phosphates. Grâce à son point de fusion très net ce dérivé a pu nous servir pour identifier l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate.

Pour la détermination des rangs d'élution des acides α et β glucométasaccharinique-6-phosphates d'une colonne de résine échangeuse d'ions, nous étions obligés d'élaborer une méthode permettant la détermination quantitative de petites quantités d'acides glucométasacchariniques phosphorylés dans l'effluent de cette colonne. Nous avons d'abord essayé la méthode décrite par EEWGRIWE (90) pour la détermination de l'acide lactique et fondée sur la décomposition d'un α -hydroxy acide par l'acide sulfurique concentré suivie d'une condensation de l'aldéhyde formé avec le p-hydroxydiphényle pour former un colorant. Dans les conditions de cette réaction l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate donne une coloration ayant un maximum d'absorption à 560 m μ , mais la sensibilité de cette détermination n'est pas satisfaisante. En revanche, nous avons pu adapter la méthode de microdétermination de phosphate organique mise au point par MACHEBOEUF et DELSAL (91). Cette méthode qui nécessite une minéralisation des échantillons analysés est moins commode que celle mentionnée précédemment, mais sa précision et sa sensibilité permettent d'obtenir des courbes d'élution sans failles.

CH A P I T R E II.

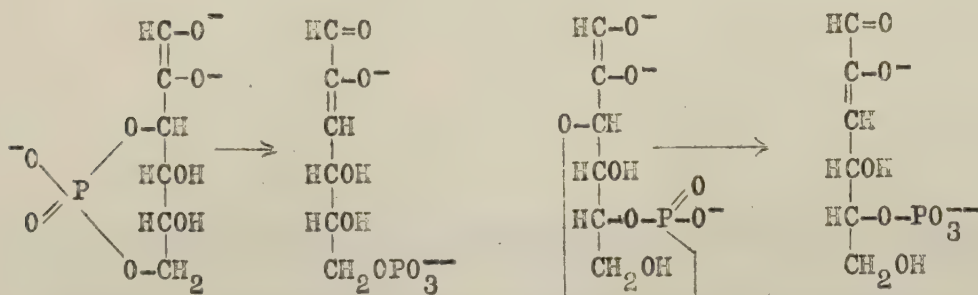
Synthèses des acides glucométasacchariniques phosphorylés par la dégradation alcaline des phosphates cycliques du glucose.

BROWN, HAYES et TODD ont démontré en 1957 (49) que le traitement du glucose-3-phosphate par la baryte fournit de l'acide gluco-métasaccharinique. De ce point de vue le résidu phosphorique se comporte donc comme le groupe alcoyloxy. L'ion de l'énediol du glucose-3-phosphate (XLIX) subit l'élimination du radical phosphorique donnant finalement de l'acide glucométasaccharinique et de l'acide phosphorique.



Notre synthèse de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate à partir de 3-méthyl-glucose-6-phosphate d'une part et les travaux de BROWN, HAYES et TODD d'autre part, nous ont amenés à penser que les 3,6- et 3,5-phosphates cycliques du glucose pourraient, par traitement alcalin, fournir les acides glucométasaccharinique-6- et -5-phosphates. Dans ces cas, l'élimination du substituant en position

3 de la chaîne carbonée devrait seulement provoquer la rupture de la liaison entre le carbone 3 et le résidu phosphorique et la molécule resterait esterifiée par le phosphate sur le carbone 6 ou 5.



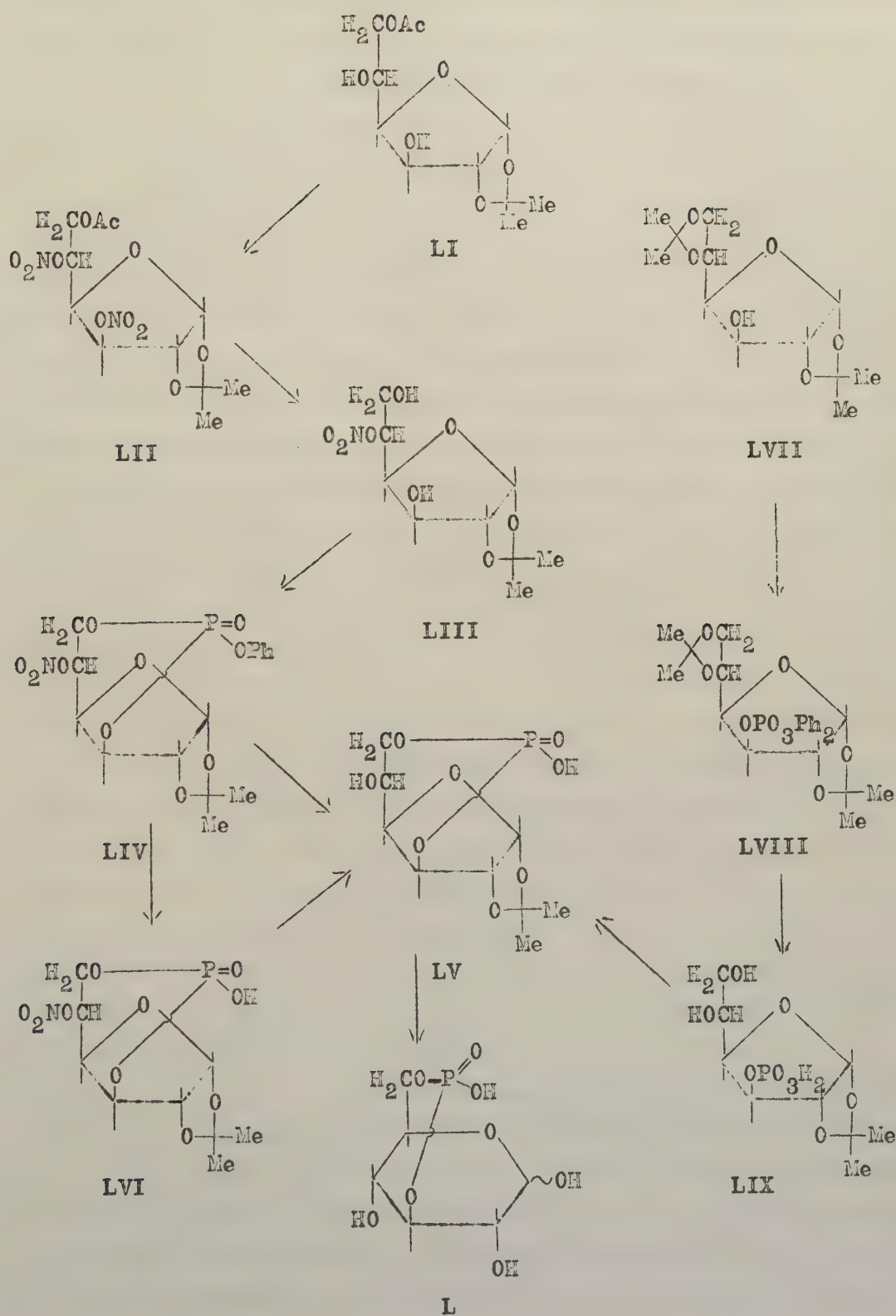
Comme nous l'avons déjà mentionné dans l'introduction, nos prévisions se sont confirmées: la dégradation alcaline des glucose-3,6- et -3,5-phosphates a donné, dans les deux cas un monophosphate de l'acide glucométasaccharinique.

Les 1,2-isopropylidène-glucose-3,6- et -3,5-phosphates cycliques sont des corps connus et relativement facilement accessibles (92,93). L'hydrolyse d'un groupement isopropylidène attaché à un sucre est, d'habitude, effectuée par un court chauffage en milieu acide: il était raisonnable de supposer que ni migration du résidu phosphorique ni rupture simultanée des cycles phosphorylés n'aura lieu pendant cette hydrolyse.

Préparation du glucose-3,6-phosphate cyclique.

Le 1,2-isopropylidène-glucose-3,6-phosphate cyclique (L) peut être préparé par deux voies différentes. L'une est fondée sur la phosphorylation du glucose convenablement protégé avec du mono-phényl-phosphorodichloridate, l'autre consiste en la cyclisation du monoacétone-glucofuranose-3-phosphate à l'aide de dicyclohexyl-carbodiimide (DCC).

Nous avons transformé le glucose en 1,2-isopropylidène-6-



acétyl glucofuranose (LI) par réaction avec l'acétone en présence d'acide orthoborique et soumis le produit à une acétylation. BELL (95) a effectué cette réaction par traitement avec l'anhydride acétique en présence d'acétate de sodium. Nous avons trouvé, que le remplacement de l'acétate de sodium par la pyridine permet d'augmenter le rendement de 30 à 65%. Le 1,2-isopropylidène-6-acétyl-glucofuranose ainsi obtenu a été nitré par l'acide nitrique anhydre au sein d'anhydride acétique (95,96). Le 1,2-isopropylidène-6-acétyl-glucofuranose-3,5-dinitrate (LII) isolé à l'état cristallin, était soumis à la réaction avec la diméthylamine, selon BELL (97), fournissant le 1,2-isopropylidène-glucofuranose-5-nitrate (LIII) sous forme de son hydrate. La phosphorylation avec le monophényl-phosphorodichloridate exigeant des conditions anhydres et le produit ne perdant pas son eau de cristallisation par séchage sans se décomposer, nous avons préparé le 1,2-isopropylidène-glucose-5-nitrate anhydre par distillation azéotropique de sa solution benzénique. La phosphorylation par le monophényl-phosphorodichloridate nous a, alors, donné le 1,2-isopropylidène-glucofuranose-5-nitrate-3,6--phénylphosphate (LIV) (92), qui perd en même temps les groupes phényle et nitrate pendant l'hydrogénation en présence de platine d'Adams et fournit le 1,2-isopropylidène-glucose-3,6-phosphate cyclique (LV). Nous avons aussi obtenu ce phosphate en traitant d'abord le monoacétone-glucose-5-nitrate-3,6-phénylphosphate (LIV) par la potasse pour éliminer le groupe phényle et soumettant ensuite le 1,2-isopropylidène-glucofuranose-5-nitrate-3,6-phosphate cyclique (LVI) à l'hydrogénolyse en présence de palladium.

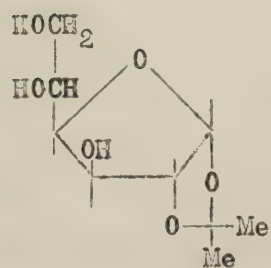
Le 1,2-isopropylidène-glucofuranose-3-phosphate, intermédiaire principal de la deuxième synthèse du 1,2-isopropylidène-glucose-3,6-phosphate cyclique, a été préparé selon la méthode de BROWN, HAYES et TODD (49). Le 1,2;5,6-diisopropylidène-glucofuranose (LVII), obtenu par la réaction du glucose avec l'acétone comme nous l'avons décrit au Chapitre I lors de la préparation du 3-méthyl-glucose-6-phosphate, a été phosphorylé par le diphénylphosphoro-

chloridate. Le 1,2;5,6-diisopropylidène-glucofuranose-3-diphényl-phosphate (LVIII) a été ensuite soumis à l'hydrogénolyse en présence de platine d'Adams, ce qui provoque l'enlèvement des groupes phényles. En même temps l'acide phosphorique libéré hydrolyse le groupe isopropylidène en 5:3 de sorte que l'on isole le 1,2-isopropylidène-glucose-3-phosphate (LIX). Ce composé est alors soumis à la cyclisation par le dicyclohexylcarbodiimide (DCC), pour donner après un traitement de 60 heures dans la pyridine aqueuse le 1,2-isopropylidène-glucose-3,6-phosphate (LV). On sait (92) que cette réaction se fait en deux étapes: le 1,2-isopropylidène-glucose-3,5-phosphate est formé d'abord et subit ensuite une transesterification lente pour donner le isopropylidène-glucose-3,6-phosphate.

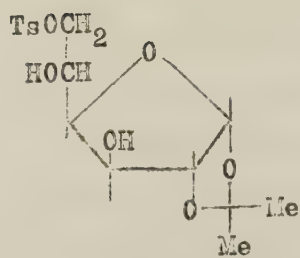
Nos expériences ont démontré que, pour hydrolyser le groupement isopropylidène fixé sur les carbones 1 et 2, il suffit de chauffer la solution décimale du 1,2-isopropylidène-glucose-3,6-phosphate cyclique (LV) sous forme d'acide libre au bain-marie bouillant pendant 10 minutes. Le glucose-3,6-phosphate cyclique (L) obtenu, a été isolé sous forme de sel de baryum. Ce composé donne des taux corrects d'analyse élémentaire et les réactions spécifiques des sucres réducteurs. L'absence d'ouverture du cycle phosphorique pendant le traitement acide est démontrée par titrage potentiométrique révélant la seule dissociation du diester. Le titrage du glucose-3,6-phosphate cyclique par le periodate confirme la structure de cette substance. Cependant la formation d'un dérivé du di-aldéhyde malonique pendant cette réaction fait apparaître une "suroxydation". Nous allons traiter ce problème plus largement dans le Chapitre quatrième de ce travail.

Préparation du glucose-3,5-phosphate cyclique.

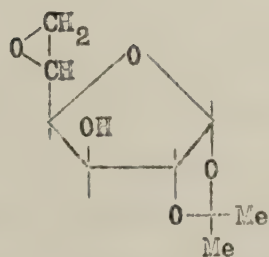
Comme substance de départ de cette synthèse nous avons choisi le 1,2-isopropylidène-glucofuranose (LX): il était préparé par condensation du glucose avec de l'acétone en présence d'a-



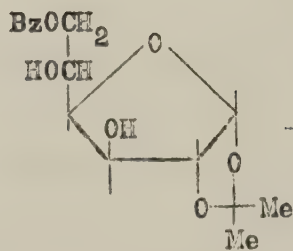
LX



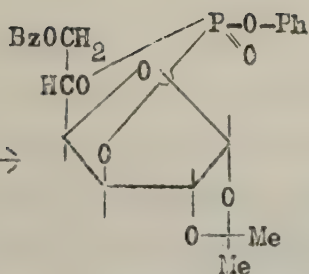
LXI



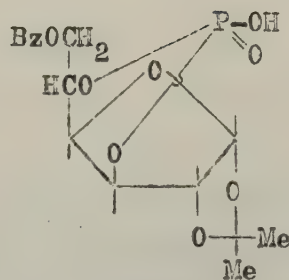
LXII



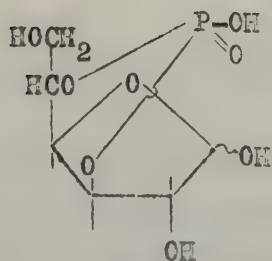
LXIII



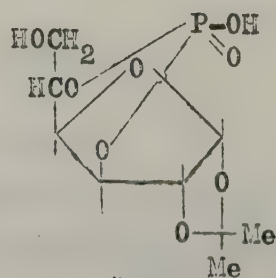
LXIV



LXV



LXVII



LXVI

cide orthoborique. Ce dernier donne un complexe avec les groupes hydroxyles attachés aux carbones 5 et 6 du glucose, empêchant la formation du diisopropylidène-glucose (94). L'action du chlorure de l'acide p-toluènesulfonique sur le 1,2-isopropylidène-glucose (98) nous a fourni le 1,2-isopropylidène-6-tosyl-glucose (LXI) lequel, après traitement alcalin selon OKLE et VARGHA (80) était transformé en 1,2-isopropylidène-5,6-anhydro-glucofuranose (LXII). Ce dernier composé étant soumis à l'action de benzylate de sodium fournissait le 1,2-isopropylidène-6-benzyl-glucofuranose (LXIII) (81). La phosphorylation de ce dérivé, possédant les groupes hydroxyles aux carbones 3 et 5 libres, était effectuée à l'aide de monophénylphosphorodichloridate (92) et le groupe phényle du 1,2-isopropylidène-6-benzyl-glucofuranose-3,5-phénylphosphate (LXIV) ainsi obtenu hydrolysé par traitement alcalin selon la méthode de MOFFATT et KHORANA (99). Nous avons enlevé le groupe benzyle du 1,2-isopropylidène-6-benzyl-glucofuranose-3,5-phosphate cyclique (LXV) ainsi préparé par hydrogénolyse en présence de palladium d'Adams, et isolé le 1,2-isopropylidène-glucofuranose-3,5-phosphate cyclique (LXI) sous forme de sel de cyclohexylammonium (92). Le 1,2-isopropylidène-glucofuranose-3,5-phosphate a été soumis à l'hydrolyse acide de la même manière que son isomère le 3,6-phosphate et le glucose-3,5-phosphate cyclique (LXVII) isolé sous forme de sel de baryum.

Nous avons caractérisé la substance par titrage potentiométrique qui démontre une seule dissociation du phosphate, par analyse élémentaire et à l'aide de titrage avec le periodate de sodium. Le glucose-3,5-phosphate cyclique possède trois groupes hydroxyles libres, dont seulement ceux attachés aux carbones 1 et 2 sont voisins; il réagit donc avec un équivalent de periodate.

Dégradation alcaline des phosphates cycliques du glucose.

Les glucose-3,6- et -3,5-phosphates cycliques ont été dégradés par la baryte de la même manière que le 3-méthyl-glucose-6-phosphate. Nous avons obtenu, par traitement du glucose-3,6-phosphate cyclique, le sel de baryum d'un acide carboxylique phosphorylé. Cette substance, dont l'analyse élémentaire correspond à un dihydrate, consomme la même quantité de periodate et donne la même courbe devitesse de la réaction avec ce réactif que l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate, obtenu par dégradation alcaline du 3-méthyl-glucose-6-phosphate. La comparaison de ces deux acides, effectuée à l'aide de chromatographie sur papier, ainsi que la comparaison de leurs anilides prouve l'identité des acides glucométasaccharinique-6-phosphates préparés par traitement du 3-méthyl-glucose-6-phosphate et du glucose-3,6-phosphate cyclique par la baryte.

Nous avons obtenu le même phosphate de l'acide glucométasaccharinique par un court traitement du glucose-3,6-phosphate avec la baryte à chaud et aussi en dégradant le phosphate cyclique par la chaux.

Ces résultats ont confirmé nos prévisions que le traitement alcalin des phosphates cycliques allait provoquer la rupture de la liaison entre le carbone 3 du sucre et le résidu phosphorique, fournissant des esters phosphoriques primaires des acides glucométasacchariniques.

Considérant l'accès facile du glucose-3,6-phosphate par la cyclisation du 1,2-isopropylidène-glucose-3-phosphate et la position clef de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate dans la synthèse du 2-désoxy-D-ribose-5-phosphate, l'importance de cette nouvelle voie de synthèse des acides glucométasacchariniques phosphorylés est évidente.

La dégradation du glucose-3,5-phosphate cyclique par la baryte a donné un sel de baryum dihydraté d'un monophosphate de l'acide glucométasaccharinique. Cela a été démontré par analyse élémentaire, par titrage conductimétrique et par la préparation de l'anilide cristallin de cet acide. Par chromatographie sur papier dans un solvant pyridinique nous avons pu mettre en évidence la très grande facilité de formation du lactone, correspondant à cet acide phosphorylé. Nous avons attribué à cette substance la structure de l'acide glucométasaccharinique-5-phosphate, considérant la suite de réactions qui nous a fourni ce corps et les résultats que donne son titrage avec le periodate de sodium. L'acide glucométasaccharinique 5-phosphate ne possède dans sa molécule qu'un seul groupement susceptible de réagir avec le periodate: le groupe α -hydroxy-carboxylique. On sait que la réaction des groupes α -diol avec le periodate est une réaction assez rapide, tandis que la réaction des α -hydroxy-acides avec le même réactif est, au contraire, très lente. Nous avons pu observer, lors du titrage de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate et de l'acide glucométasaccharinique, que les groupements diol vicinaux de ces acides réagissent rapidement, en une à deux heures, avec la quantité théorique de periodate. Au contraire, l'acide glucométasaccharinique phosphorylé, obtenu par dégradation alcaline du glucose-3,5-phosphate ne consomme que très lentement, en 500 heures environ, un équivalent de ce réactif, comportement qui justifie l'attribution à ce composé la structure de l'acide glucométasaccharinique-5-phosphate.

En dehors de leur comportement vers le periodate, les acides glucométasaccharinique-5- et -6-phosphates peuvent être également distingués l'un de l'autre, par les constantes physiques de leurs anilides. En revanche, nous n'avons pu séparer ni les acides, ni les lactones, ni les anilides par chromatographie sur papier, malgré de très nombreux essais dans différents solvants. L'électrophorèse sur papier n'a pas donné de meilleurs résultats non plus.

Nous avons alors espéré qu'à l'aide de chromatographie sur des colonnes de résines échangeuses d'ions nous pourrions effectuer la séparation des deux acides. A priori, deux facteurs pouvaient favoriser cette séparation. D'une part il est connu que les constantes de dissociation des radicaux phosphoriques estérifiant un sucre varient selon la position stérique qu'occupe le groupe hydroxyle esterifié par l'acide phosphorique (93): or dans l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate l'acide phosphorique est lié à un alcool primaire, tandis que dans le 5-phosphate il esterifie un alcool secondaire. D'autre part, l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate, grâce aux deux groupes hydroxyles voisins des carbones 4 et 5, peut former un complexe avec l'acide borique, tandis que aucun groupe diol voisin n'existe dans la molécule du 5-phosphate. Par conséquent les acides glucométasaccharinique-5- et -6-phosphates ont été adsorbés sur une colonne de la résine analytique Dowex 2 en forme de sulfate et élués par des solutions d'acide sulfurique dont nous avons varié la concentration. L'acide sulfurique, dans des concentrations provoquant l'élution des acides adsorbés sur la colonne (l'ordre de 0,01 N), ne permet aucune séparation des isomères. Nous avons tiré de ces expériences la conclusion que la différence entre les acidités des deux acides glucométasacchariniques phosphorylés -si elle existe- est trop petite pour déterminer leur désorption sélective d'une résine fortement basique.

Nous avons, alors, remplacé le DOWEX 2 par la cellulose ECTEOLA, un échangeur d'ions possédant le caractère d'une base faible. Nous avons élué les acides glucométasacchariniques phosphorylés, adsorbés sur une colonne de ECTEOLA sous forme de carbonate, à l'aide d'une solution de carbonate de potassium, dont la concentration augmentait d'une façon constante et linéaire. Pour cette fin nous avons utilisé le système d'élution à gradient de force ionique (100,101,102) et atteint la linéarité de la variation en appliquant les bases théoriques, concernant ce sujet, développées par LAKSHMANAN et LIEBERMAN (103). Dans ces conditions aussi, tous les

deux acides glucométasacchariniques phosphorylés ont été retrouvés dans les fractions correspondant à une concentration de carbonate 0,01 N. Le remplacement du carbonate par le bicarbonate de potassium et l'usage de la colonne de ECTEOLA sous forme de bicarbonate n'ont pas donné une séparation des deux acides glucométasacchariniques phosphorylés non plus.

Dans l'espoir que la formation de complexes acides avec le borate permettra la séparation, nous avons adsorbé les deux phosphates sur une colonne de résine Dowex 1 en forme de borate et élué avec des solutions de borate de potassium de concentrations différentes. Enfin, nous avons utilisé une colonne en forme de chlorure et élué avec des solutions contenant simultanément du chlorure et du borate de potassium (104), mais ni cette expérience, ni la précédente ne nous ont amené à la séparation désirée.

Malgré ces résultats décevants certaines courbes d'élution nous font penser que la séparation des deux phosphates pourra être effectuée, mais en utilisant de très longues colonnes (plus d'un mètre) sous pression.

CH A P I T R E III.

Préparation et caractéristiques du 2-désoxy-D-ribose- 5-phosphate.

La réaction entre un acide aldonique et l'eau oxygénée, en présence d'acétate ferrique, a été décrite, pour la première fois en 1898 par RUFF (28) qui a donné son nom à cette dégradation. Les rendements relativement faibles et l'importance assez limitée de cette transformation étaient la cause de l'intérêt minime pour ce travail pendant le demi-siècle suivant. Il y a cependant à noter les travaux de HOCKETT (105,106) qui a synthétisé, en utilisant la méthode de RUFF, le D-arabinose et le D-thréose. Depuis les travaux de KENNER et RICHARDS (58,59) déjà discutés, on observe l'acroissement de l'intérêt pour la méthode de RUFF, qui est devenu l'élément indispensable des synthèses de 2-désoxyribose (29,30,31,49).

Selon notre connaissance personne n'a effectué avant nous cette dégradation sur des acides aldoniques phosphorylés.

La transformation d'un acide aldonique en aldose, contenant un atome de carbone en moins, est une décarboxylation oxydative. Néanmoins, le mode d'action de l'eau oxygénée et le rôle du sel ferrique n'ont jamais été étudiés, de sorte que nous ignorons le mécanisme de cette réaction.

Les préparations de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate, décrites dans le premier et deuxième chapitre de ce travail, fournissent un mélange des isomères et de ce composé, sous

forme de sel de baryum. Pour la dégradation de RUFF on peut utiliser ce mélange, sans séparer les isomères α et β , car le carbone 2 des acides glucométasacchariniques devenant le premier atome de carbone du désoxyribose aura, de ce fait, perdu son asymétrie. En revanche, à cause de la très faible solubilité du sel de baryum de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate dans l'eau, nous étions obligés de le transformer en sel de potassium, bien qu'en général ce soient des sels alcalino-terreux des acides aldoniques qui sont soumis à la dégradation de RUFF.

Déjà les premiers essais sur micro-échelle ont démontré que la dégradation s'effectuait donnant un corps nouveau, bien séparable sur chromatogrammes de la substance de départ. Sur le papier, ce corps donnait des réactions positives avec le phtalate d'aniline (pouvoir réducteur), le periodate de sodium (présence du groupement d'un diol voisin), le réactif de molybdate (présence de phosphate organique) et le réactif de DISCHE modifié pour développement sur chromatogrammes (107) (présence de 2-désoxyribose). Cette substance avait la même valeur R_f que le désoxyribose-5-phosphate, décrit par RACKER (15,16), sur un chromatogramme développé dans le même solvant qu'avait utilisé cet auteur. Après ces expériences nous avons aussi pu constater que les rendements du désoxyribose-5-phosphate formé ne sont pas élevés. Mais ni l'augmentation de la température de la réaction, ni l'addition de plus grandes quantités d'eau oxygénée, ni la prolongation du temps de la réaction n'ont eu aucune influence visible sur la proportion entre les quantités de la substance de départ non dégradée et le désoxyribose-5-phosphate formé.

Les essais pour obtenir le désoxyribose-5-phosphate à l'état pur par cristallisation fractionnée des sels de baryum ou des sels de brucine, isolés du mélange réactionnel après la dégradation de RUFF, n'ont pas donné les résultats désirés. Nous avons alors essayé d'utiliser la méthode de séparation des nucléotides développée par COHN (104). Cette méthode consiste en l'adsorption d'un mé-

lange de phosphates sur une colonne de résine basique échangeuse d'ions en forme de formiate et l'élution des corps adsorbés par l'acide formique de concentrations différentes. L'adsorption du mélange réactionnel, obtenu après la dégradation de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate avec de l'eau oxygénée, sur une colonne de Dowex 2 en forme de formiate et les essais d'élution sélective par de l'acide formique 0,05 N, 0,25 N, 1 N et finalement par une solution de formiate d'ammonium 2 N contenant de l'acide formique 0,5 N, n'ont pas donné une séparation des constituants du mélange. Nous n'avons même pas réussi à récupérer des phosphates adsorbés sur la colonne. A notre avis, l'acide formique, bien qu'étant un acide suffisamment fort pour déssorber les nucléotides d'une colonne basique, n'est pas en mesure d'éluer les phosphates primaires des glucides, dont le degré de dissociation est beaucoup plus fort que celui des nucléotides. La réussite de cette séparation, en éluant la colonne par un acide plus fort, a confirmé notre raisonnement.

Pour effectuer la séparation nous avons adsorbé le mélange réactionnel sur une colonne de résine échangeuse d'ions Dowex 2 en forme de sulfate et élué à l'aide d'acide sulfurique 0,02 N. Les fractions sortant de la colonne étaient examinées pour révéler la présence de phosphate organique par le molybdate et celle du désoxyribose par le réactif de diphénylamine de DISCHE (108). Dans ces conditions le 2-désoxy-D-ribose-5-phosphate est retrouvé dans l'effluent de la colonne, comme la première substance contenant du phosphate. Il est suivi par une petite quantité de phosphate inorganique. La solution sortant ensuite de la colonne contient une quantité considérable d'acide glucométasaccharinique-6-phosphate non dégradé pendant la réaction. Nous avons collecté séparément les fractions contenant le désoxyribose-5-phosphate et celles contenant l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate. Le désoxyribose-5-phosphate fut ensuite isolé sous forme de sel de baryum. En tenant compte de la quantité d'acide glucométasaccharinique-6-phosphate récupéré

le rendement du désoxyribose-5-phosphate atteint 20% de la théorie.

Pour l'analyse élémentaire nous avons aussi préparé le sel de cyclohexylammonium cristallin. Ce dernier corps est si instable, qu'après quelques jours il devient brun et résineux. Donc, pour les recherches, ayant comme but la confirmation de la structure du désoxyribose-5-phosphate, nous avons utilisé le sel de baryum seulement.

Le désoxyribose-5-phosphate consomme lentement un équivalent de periodate de sodium. Ce résultat est en accord avec le mécanisme classique de l'oxydation par ce réactif. Dans la molécule du désoxyribose-5-phosphate le seul groupement diol voisin est celui situé sur les carbones 3 et 4. Si, en solution, cette molécule existe dans sa forme cyclique (le ribofuranose étant la seule structure cyclique possible), l'oxydation avec le periodate nécessite l'ouverture préliminaire du cycle furanoïde, ce qui explique la longue durée de la réaction.

Le titrage potentiométrique du 2-désoxy-D-ribose-5-phosphate démontre la présence d'un ester phosphorique primaire. La courbe obtenue par ce titrage indique d'une façon nette deux dissociations acides.

Nous avons établi que notre produit est un dérivé du 2-désoxyribose par la réaction avec la diphenylamine, dans les conditions spécifiées par DISCHE (108): on obtient une coloration bleue, dont la courbe d'absorption correspond bien à celle du 2-désoxyribose non phosphorylé.

CHAPITRE IV.

Réactions des glucides phosphorylés avec le periodate.

Le mécanisme classique de l'oxydation des composés hydroxylés par le periodate est la rupture de la chaîne carbonée entre deux carbones contigus, liés chacun avec un groupe hydroxyle. Pendant cette réaction un équivalent de periodate est réduit et les hydroxyles des carbones attaqués sont oxydés, formant des groupes carbonyles. Les groupes carboxyle et carbonyle, ce dernier sous sa forme hydratée, réagissent comme des groupes hydroxyles. Dans ces cas les produits de la réaction ont un degré d'oxydation plus élevé: on obtient de l'anhydride carbonique ou des acides carboxyliques. Aussi, la vitesse d'oxydation des α -hydroxy-acides et α -hydroxy-cétones par le periodate est différente de celle des composés possédant un groupement α -diol.

Les réactions des glucides avec le periodate montrent parfois une consommation plus élevée de ce réactif que celle prévue par les règles générales discutées brièvement ci-dessus. Ce phénomène, appelé "suroxydation", est souvent dû aux conditions de pH ou de température, favorisant des réactions secondaires. Néanmoins, on connaît beaucoup de travaux décrivant des oxydations par le periodate, ne pouvant être expliquées par le schéma classique de cette réaction.

Des études, faites en même temps par FLEURY et COURTOIS en France (109) et par SPRINSON et CHARGAFF (110) ainsi que par HUEBNER, AMES et BUBL (111) en Amérique, ont démontré qu'un

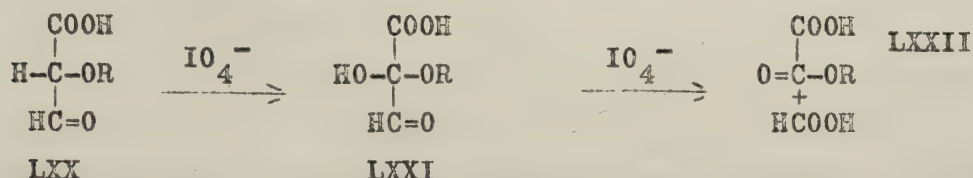
hydrogène, activé par le voisinage de deux groupes carboxyles, est susceptible d'être oxydé par le periodate. Il a été démontré que l'acide malonique est attaqué par ce réactif et qu'il en consomme rapidement trois équivalents, formant deux moles de CO_2 et une mole d'acide formique. Ces résultats ne s'expliquent que par l'hydroxylation du carbone 2 de l'acide malonique (LXVIII) et formation d'acide tartronique (LXIX), celui-ci pouvant ensuite être oxydé par le periodate, selon le mécanisme classique.



L'oxydation de l'hydrogène dans la molécule de l'acide malonique est plus lente que l'oxydation du système α -glycol, mais beaucoup plus rapide que celle des systèmes α -hydroxy-carbonyle ou α -hydroxy-carboxyle. Comme cela a été démontré par FLEURY et COURTOIS (109), la vitesse de cette oxydation dépend du pH; elle atteint son maximum vers pH 4 - 5, tandis qu'aux pH 0 ou au dessus de 9 la réaction n'a pratiquement pas lieu.

L'hypothèse que, pendant l'oxydation de l'acide malonique, le premier équivalent de periodate est utilisé pour oxyder le carbone 2, a été confirmée par une expérience de HUEBNER, AMES et BUBL (111). Ils ont soumis l'acide 2-O-éthyl-malonique à l'action du periodate et obtenu de l'acide propionique au lieu d'acide formique, qui se forme lors de l'oxydation de l'acide malonique non-substitué. De travaux plus récents ont démontré que non seulement l'hydrogène activé par deux groupes carboxyles (le cas de l'acide malonique et ses dérivés) peut être oxydé par le periodate, mais aussi l'hydrogène voisin d'autres groupes électrophiles. Le traitement des éthers méthyliques des acides hexopyranuroniques par le periodate donne l'éther méthylique de l'acide C-

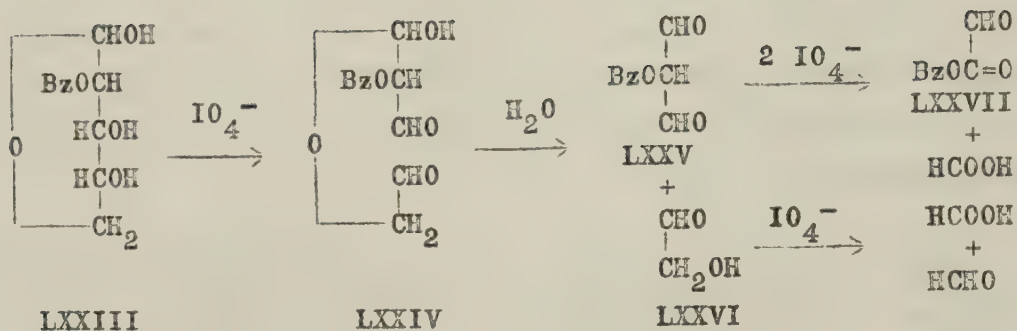
formyl-glycolique (LXX). EDINGTON, HIRST et PERCIVAL (112) ont observé que ce composé consomme du periodate, en se transformant en LXXI qui est ensuite oxydé selon le mécanisme classique pour donner l'ester de l'acide oxalique LXXII, stable dans les conditions de cette réaction.



Une réaction pareille a été décrite, en 1958, par HOUGH, TAYLOR, THOMAS et WOODS (113).

L'oxydation d'un hydrogène, lié à un carbone qui est situé entre deux groupes carbonyles, a été observé pour la première fois par WOLFROM et BOBBIT en 1956 (114). Ces auteurs ont démontré que les 1,3-dicétones cycliques réagissent avec le periodate pour former des acides bi-basiques par élimination du carbone 2 sous forme de CO_2 . Dans le cas des dicétones substitués en position 2, l'oxydation donne l'acide carboxylique correspondant au substituant, au lieu de l'anhydride carbonique.

Des dérivés 2-0-substitués du dialdéhyde hydroxymalonique ont été souvent postulés comme intermédiaires de l'oxydation des glucides par le periodate (par exemple: 115,116,117, 118,119,120). Cependant, selon notre connaissance, il n'y a qu'un seul travail décrivant l'isolement de cet intermédiaire et l'étude de ses réactions avec le periodate. En 1956 SCHWARZ et MacDOUGALL (121) ont publié les résultats de l'oxydation du 2-0-benzyl-arabinose par le periodate (LXXIII). Ce composé réagit avec une mole d'oxydant pour donner l'intermédiaire LXXIV lequel, après hydrolyse, se transforme en 2-0-benzyl-hydroxymalondialdéhyde (LXXV) et aldéhyde glycolique (LXXVI).



SCHWARZ et MacDOUGALL ont isolé et identifié le 2-0-benzyl-hydroxymalondialdéhyde (LXXV) ainsi que le produit de son oxydation, le glyoxalate de benzyle (LXXVII). Ils ont démontré que le 2-0-benzyl-hydroxymalondialdéhyde (LXXV) consomme deux moles de periodate avec une vitesse plus grande que n'est la vitesse de l'hydrolyse de l'intermédiaire LXXIV.

Ce travail, ainsi que plusieurs autres déjà cités, démontrent que le phénomène de "suroxydation", traité jusqu'à maintenant comme un ensemble de réactions indésirées et voilant la netteté des résultats des déterminations de structure des glucides à l'aide de titrage par le periodate, peut servir pour établir la constitution des sucres et celles de leurs dérivés.

Lors des oxydations avec le periodate, le dialdéhyde malonique peut être formé à partir des désoxy-sucres possédant le groupe désoxy voisin aux deux systèmes α -glycoliques, dont un peut être remplacé par le groupement aldéhyde. Les dérivés du hydroxymalondialdéhyde peuvent se former à partir des glucides 0-substitués de la même manière. Comme substituants l'oxygène du cycle furanoïde, les résidus glucidiques (115) ainsi que les radicaux alcoyles, aryles et acyles peuvent également servir.

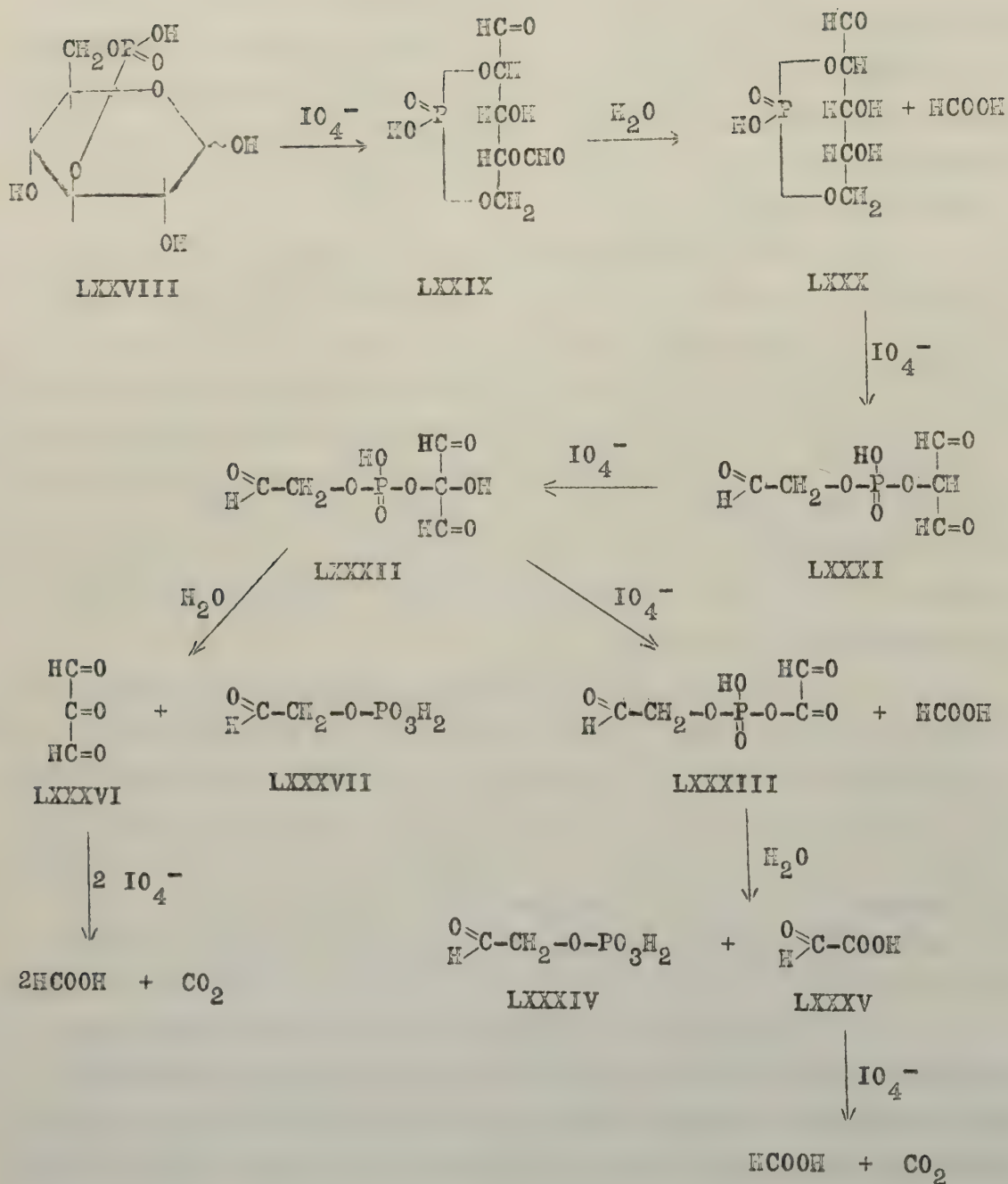
Nous avons utilisé les titrages avec le periodate pour confirmer la structure des phosphates de glucides synthétisés. Les résultats des titrages du glucose-3,6-phosphate cyclique et de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate indiquent que ces réactions ne suivent pas le schéma classique de l'oxydation avec l'acide periodique.

Dans la molécule du glucose-3,6-phosphate cyclique le carbone 3, portant le résidu phosphorique, est voisin de deux systèmes α -glycoliques situés sur les atomes 1,2 et 4,5 de la chaîne carbonée. La formation de l'hydroxymalondialdéhyde à partir de ce phosphate cyclique est possible pendant l'oxydation par le periodate. Pareillement, la molécule de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate, dont le groupement désoxy est situé entre un diol voisin (carbones 4 et 5) et un groupement α -hydroxy-carboxyle (carbones 1 et 2) peut donner le dialdéhyde malonique lors de la réaction avec le periodate.

Nous avons fait réagir le glucose-3,6-phosphate cyclique avec un excès de 7 moles de periodate de sodium. Après la consommation immédiate d'un équivalent d'oxydant la réaction ralentit considérablement mais continue pour ne s'arrêter qu'après avoir réduit 4,7 moles de periodate. Les expériences effectuées en milieu non tamponné et en milieu tamponné à pH 3,2 ont donné les mêmes taux de consommation de periodate et les mêmes courbes de vitesse de la réaction.

En prenant en considération les travaux cités, que viendront corroborer d'autres que nous discuterons ci-dessous, nous proposons le schéma suivant pour décrire la suite des réactions pendant l'oxydation du glucose-3,6-phosphate cyclique (LXXVIII) par le periodate.

Le premier équivalent d'acide periodique attaque le groupement α -glycol sur les carbones 1 et 2, et forme le formyl-arabinose-2,5-phosphate cyclique (LXXIX). Au sujet de cette for-



L'oxydation du glucose-3,6-phosphate cyclique
par le periodate.

mule il est à remarquer que nous ne savons pas si le glucose-3,6-phosphate réagit dans sa forme pyranoïde (LXXVIII) ou furanoïde. Si le phosphate, attaqué par le periodate, est dans sa forme furanoïde, le produit LXXIX serait esterifié par l'acide formique en position 3. En tout cas, l'hydrolyse, quelle que soit la structure de l'intermédiaire, donne de l'acide formique et de l'arabinose-2,5-phosphate cyclique (LXXX). Ce dernier possède un groupement α -glycol situé sur les carbones 3 et 4. La réaction de cette substance avec le periodate doit être très rapide, ainsi que les réactions suivantes.

Nous expliquons donc le ralentissement de la réaction du glucose-3,6-phosphate cyclique après la consommation immédiate du premier équivalent de periodate, par la vitesse peu élevée de l'hydrolyse du formyl-arabinose-2,5-phosphate cyclique (LXXIX). Cette hypothèse est en accord avec l'observation de SCHWARZ et MacDOUGALL (121) qui ont trouvé que l'hydrolyse du composé LXXIV est plus lente que l'oxydation des produits de cette hydrolyse par le periodate. Elle l'est aussi avec les résultats du travail de MOFFATT et KHORANA (99) sur l'oxydation du D-xylose-3-phosphate, qui ont observé le ralentissement de la vitesse de l'oxydation par le periodate après la consommation rapide du premier équivalent du réactif, dû à l'hydrolyse lente d'un ester formique. Leur courbe, obtenue lors du titrage du xylose-3-phosphate par le periodate, a la même forme que la courbe de vitesse de l'oxydation du glucose-3,6-phosphate cyclique.

L'arabinose-2,5-phosphate cyclique (LXXX), formé à partir de son dérivé formylé (LXXIX), réagit avec le second équivalent de periodate pour donner l'ester phosphorique mixte de l'aldéhyde glycolique et de l'hydroxymalondialdéhyde (LXXXI). Ce composé possède un hydrogène activé par deux groupes aldéhydes voisins. L'oxydation de substances d'une constitution semblable par le periodate a déjà été discutée. L'hydroxylation des 2-O-dérivés du dialdéhyde malonique a été suggérée par SCHWARZ et MacDOUGALL

(121) pour le dérivé O-benzyl, par HOUGH et ses collaborateurs (119) pour le dérivé O-méthyl et par KHYM, DOHERTY et COHN (120) pour un ester phosphorique de l'hydroxy-malondialdéhyde. Par analogie nous proposons que la réaction de l'ester LXXXI avec une mole de periodate consiste en l'oxydation du carbone 2 du dérivé du malondialdéhyde et fournit le produit LXXXII. Par analogie aux travaux cités, nous proposons que les réactions suivantes ont lieu pendant l'oxydation du phosphate mixte de l'aldéhyde glycolique et l'hydrate de l'aldéhyde mésoxalique (LXXXII).

Ce composé (LXXXII) peut être dégradé par deux voies différentes pour donner les mêmes produits finaux et en consommant deux équivalents de periodate. Le produit LXXXII, dont la liaison entre le carbone 2 du dialdéhyde et le résidu phosphorique est affaiblie par l'influence des substituants électrophiles sur ce carbone, peut facilement subir une hydrolyse donnant de l'aldéhyde mésoxalique (LXXXVI) et du glycolaldéhyde-phosphate (LXXXVII). Le deuxième produit n'est pas attaqué par le periodate, tandis que l'aldéhyde mésoxalique (LXXXVI) consomme rapidement deux moles de ce réactif pour donner deux équivalents d'acide formique et un équivalent de CO_2 .

Dans la route alternative des transformations du phosphate mixte de l'aldéhyde glycolique et du hydrate de l'aldéhyde mésoxalique (LXXXII), l'attaque de l'oxydant précède l'hydrolyse de la liaison phosphorique. La consommation d'un équivalent de periodate par le composé LXXXII provoque la formation simultanée du phosphate mixte du glycolaldéhyde et de l'acide glycolique (LXXXIII) et d'une mole d'acide formique. Le corps LXXXIII subit une hydrolyse, formant du glycolaldéhyde phosphate (LXXXIV), stable envers le periodate, et de l'acide glyoxylique (LXXXV) qui est, à son tour, oxydé par un équivalent de ce réactif pour donner une mole d'acide formique et une mole de CO_2 .

Toutes les deux suites de réactions, décrites ci-dessus, ont probablement lieu pendant l'oxydation des dérivés 2-0-substitués de l'hydroxy-malondialdéhyde par le periodate. Dans les travaux décrivant l'oxydation periodique des sucres substitués en 3 ou 4 par un radical glucidyl ou alcoyl, on considère comme route principale l'oxydation directe du dérivé de l'aldéhyde mésoxalique (composés analogues au LXXXII)(116), mais certains chercheurs pensent que l'hydrolyse du composé, suivie par l'oxydation de l'aldéhyde mésoxalique (LXXXVI) formé, peut aussi jouer un rôle (113,117, 118). HOUGH et ses collaborateurs (119) ont postulé la formation du 2-méthoxy-malondialdéhyde pendant l'oxydation periodique du 3-0-méthyl glucitol. Considérant les taux de periodate consommé et les résultats d'analyse des produits de cette réaction, ils ont trouvé que, dans le cas des dérivés 0-alcoyl du hydroxy-malondialdéhyde, l'ester de l'acide glyoxylique formé est stable envers le periodate (composé analogue à LXXXIII). HOUGH et ses collaborateurs ont calculé à partir de ces résultats la proportion du dérivé du malondialdéhyde dégradé par une route et par l'autre (119, 122). La stabilité de l'ester benzylique de l'acide glyoxylique a été démontré par SCHWARZ et MacDOUGALL dans le travail déjà mentionné.

Les dérivés de l'acide glyoxalique, qui peuvent être formés pendant l'oxydation de certains phosphates de sucres, n'ont pas le caractère d'un ester mais d'un anhydride mixte: leur stabilité est donc beaucoup moindre. Ce raisonnement est confirmé par les résultats des titrages periodiques du glucose-3,6-phosphate ainsi que par les études déjà mentionnées de MOFFATT et KHORANA (99), portant sur la réaction du xylitol-3-phosphate et du xylose-3-phosphate avec le periodate. Ces deux phosphates de glucides réagissent avec 5 équivalents d'oxydant. MOFFATT et KHORANA considèrent ces taux élevées de consommation de periodate comme une suroxydation, probablement due à la formation et à l'oxydation du phosphate du 2-hydroxy-malondialdéhyde. Leurs résultats sont parfaitement en accord avec le mécanisme de l'oxydation du glucose-3,6-

phosphate cyclique que nous proposons: les xylose- et xylitol-6-phosphates, après réduction de deux moles de periodate donnent le phosphate du hydroxy-malondialdéhyde, qui consomme ensuite 3 équivalents du réactif, en étant dégradé selon une des routes proposées pour fournir deux moles d'acide formique, une mole de CO_2 et une mole d'acide phosphorique.

Il y a cependant deux travaux portant sur l'oxydation periodique des phosphates de sucres, où le phosphate du dialdéhyde hydroxymalonique est proposé comme intermédiaire, mais les résultats suggèrent que ce composé peut être oxydé par quatre équivalents de periodate.

En 1945 COURTOIS et RALET (123) ont décrit leurs études sur l'oxydation du glucose-2-phosphate. Ce composé, après la consommation de trois moles du réactif, forme le phosphate du hydroxy-malondialdéhyde. Selon la suite des réactions décrites ci-dessus, ce produit devrait réagir avec trois équivalents de periodate. Néanmoins, COURTOIS et RALET ont trouvé que le glucose-2-phosphate est oxydé par 7 moles de periodate, dont quatre sont considérés comme réduites par le phosphate du hydroxy-malondialdéhyde. Des résultats pareils ont été décrits par KEYM, DOHERTY et COHN (120): le ribitol-3-phosphate et le ribose-2- et -3-phosphates, préparés par ces auteurs, consomment chacun 6 moles de periodate. Selon le schéma classique des oxydations periodiques ces trois phosphates devraient être dégradés par deux équivalents de réactif pour donner le phosphate du hydroxy-malondialdéhyde. KEYM, DOHERTY et COHN suggèrent que ce dernier composé est responsable de la consommation des quatre moles de periodate, ce qui est en contradiction avec le schéma de l'oxydation des dérivés du hydroxy-malondialdéhyde proposé par nous et avec les résultats d'analyse des produits finaux de l'oxydation d'autres glucides confirmant cette suite de transformations (118,119,121,112,111,109,117,116,115,114).

KEYM, DOHERTY et COHN (120) n'ont pas donné des dé-

tails concernant la technique de leur travail, tandis que l'oxydation du glucose-2-phosphate par le periodate décrite par COURTOIS et RAMET (123) était effectuée dans des conditions qui ne sont pas comparables avec celles utilisées par nous et dans la plupart des travaux cités.

Nous considérons la suite des transformations du glucose-3,6-phosphate cyclique pendant l'oxydation avec le periodate, proposée ici, comme une hypothèse qui exige encore une vérification expérimentale. Nous pensons que des déterminations quantitatives d'acide formique et d'anhydride carbonique formés lors de cette réaction confirmeront nos prévisions. Il faut cependant souligner que ce schéma est le seul capable d'expliquer nos résultats expérimentaux et qui, par surcroît, est confirmé par les données expérimentales décrites dans la grande majorité des travaux analogues.

Les titrages, par le periodate, des acides glucométasaccharinique-5- et -6-phosphates, obtenus pendant ce travail, indiquent que l'oxydation de ces corps est aussi compliquée par les phénomènes de "suroxydation" qui peuvent être expliqués d'une manière semblable à la dégradation du glucose-3,6-phosphate cyclique par ce réactif. Pour établir le caractère de cette "suroxydation" ainsi que pour nous rendre compte de l'influence du résidu phosphorique présent dans la molécule, nous avons soumis à l'oxydation periodique non pas seulement les acides glucométasacchariniques phosphorylés, mais aussi le composé ne contenant pas de phosphore.

L'acide glucométasaccharinique possède quatre groupes hydroxyles, dont trois voisins, qui forment un système de deux diols. Le 6-phosphate de cet acide n'a qu'un seul groupement diol, tandis que l'acide glucométasaccharinique-5-phosphate ne contient pas de système α -glycol. Nous avons pensé que l'établissement des courbes de vitesse de réaction de ces corps avec le periodate pourrait servir pour distinguer les deux phosphates de l'acide glucométasaccharinique l'un de l'autre et aussi pour confirmer leurs structures.

Puisque les acides glucométasacchariniques se lactonisent facilement en milieu acide, nous n'avons pas utilisé de tampon pour le titrage de ces corps avec le periodate. A ce sujet il faut remarquer le fait bien connu, qu'un pH alcalin ou neutre favorise la "suroxydation" par le periodate. (115). Au cours de nos études sur l'oxydation des acides glucométasacchariniques avec le periodate, nous avons observé des taux de consommation de l'oxydant, qui peuvent être considérés comme une suroxydation. Nous allons proposer une suite de réactions qui permet de comprendre cette "suroxydation".

L'acide glucométasaccharinique non-phosphorylé consomme deux moles de periodate pendant les deux premières heures de la réaction. L'acide glucométasaccharinique-6-phosphate réagit avec un équivalent du réactif dans la même période de temps, tandis que la quantité du periodate de sodium consommé dans les mêmes conditions par l'acide glucométasaccharinique-5-phosphate est négligeable. Ces résultats sont en accord avec le schéma classique d'oxydation et sont satisfaisants pour nos buts: en comparant ces chiffres, on peut distinguer l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate de son isomère, le 5-phosphate et les résultats confirment les structures des substances que nous avons synthétisées.

Cependant la réaction de l'acide glucométasaccharinique avec le periodate ne s'arrête pas complètement après la consommation de deux moles de ce réactif: elle continue, mais elle ralentit beaucoup. La consommation d'un troisième équivalent du periodate demande 100 heures environs et la réaction continue encore en s'approchant asymptotiquement d'une valeur de 6 moles de periodate utilisé. L'acide glucométasaccharinique-6-phosphate consomme en 100 heures un deuxième équivalent du réactif et, comme dans le cas de l'acide non-phosphorylé, la réaction ne s'arrête pas mais elle continue, pour atteindre après une longue période de temps, la valeur de 5 moles de periodate consommé. Cependant, ce taux final

est atteint plus lentement par l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate que par le composé non-phosphorylé.

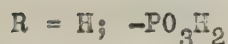
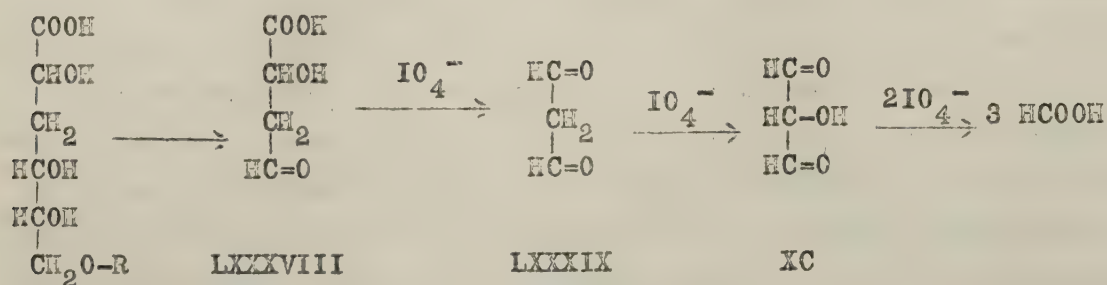
L'acide glucométasaccharinique-5-phosphate est aussi attaqué par le periodate, mais après 550 heures il n'a réagi qu'avec 0,78 équivalents de ce réactif.

Cette lente réaction secondaire des acides glucométasacchariniques avec le periodate est due, à notre avis, à l'oxydation du groupement d' α -hydroxy-acide, présent sur les carbones 1 et 2 de ces composés. La susceptibilité des α -hydroxy-acides d'être oxydés par l'acide periodique a été démontré, pour la première fois, par FLEURY et BOISSON (124). Cette réaction fournit de l'anhydride carbonique et un aldéhyde, en réduisant un équivalent d'oxydant. Elle est beaucoup moins rapide qu'une oxydation du système α -glycol, ce qui a été démontré par COURTOIS et GUERNET (125) et par d'autres (110,118,126).

Comme nous venons de le dire, il existe une différence notable entre la vitesse de "suroxydation" de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate et l'acide glucométasaccharinique d'une part, et la vitesse de "suroxydation" de l'acide glucométasaccharinique-5-phosphate d'autre part. Pour expliquer cette différence, nous proposons le raisonnement suivant:

L'acide glucométasaccharinique et l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate donnent de l'acide 3-C-formyl-lactique (LXXXVIII), lorsque les systèmes α -glycol ont été oxydés par le periodate. Cet intermédiaire d'oxydation, commun des deux acides, possède un groupement de α -hydroxy-acide: il est donc dégradé par un équivalent de periodate, pour donner le dialdéhyde malonique (LXXXIX). Nous avons démontré la formation de ce dernier corps (LXXXIX), pendant le traitement de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate par le periodate, à l'aide d'une réaction spécifique, mise au point par WARAVDEKAR et SASLAW (127). Le mélange réactionnel, obtenu après l'oxydation de l'acide phosphorylé et sou-

mis à la réaction avec l'acide thiobarbiturique, a fourni un colorant, dont le maximum d'absorption est le même que décrivent WARAVDEKAR et SASLAW pour leurs dérivés du dialdéhyde malonique. Les travaux portant sur l'oxydation des dérivés du dialdéhyde malonique, ont déjà été discutés dans ce chapitre (115,116,117,118,119, 120,121).



Par analogie à ces travaux et aux résultats des études sur l'oxydation du glucose-3,6-phosphate cyclique par le periodate, nous avons admis la possibilité d'une hydroxylation relativement rapide du dialdéhyde malonique (LXXXIX), donnant le dialdéhyde hydroxy-malonique (XC). Ce dernier composé peut être oxydé par deux moles de periodate en fournissant trois équivalents d'acide formique.

Les résultats de l'oxydation de différentes 2-désoxyaldoses, publiés récemment par LEE (128), ont confirmé la suite des transformations du dialdéhyde malonique que nous proposons. Tous les 2-désoxysucres, examinés par LEE donnent, après l'oxydation de leurs systèmes α -glycol, le dialdéhyde malonique, qui a été isolé et identifié sous forme de son dérivé de cuivre. Les taux de periodate consommé pendant l'oxydation des 2-désoxyaldoses, ainsi que les résultats des déterminations de l'acide formique formé, sont en accord avec le mécanisme d'oxydation par le periodate du dialdéhyde malonique que nous avons proposé.

Le travail de LEE (128), ainsi que les faits discutés précédemment, démontrent que l'oxydation du dialdéhyde malonique par le periodate est plus rapide que celle d'un α -hydroxy-acide. Donc, la vitesse de consommation du periodate par l'acide glucométasaccharinique et par son dérivé le 6-phosphate est limitée, après l'oxydation des systèmes α -glycoliques, par l'oxydation lente du groupement α -hydroxy-acide.

La molécule de l'acide glucométasaccharinique-5-phosphate, ne possédant aucun système glycolique, n'est oxydé par le periodate de sodium qu'au groupement α -hydroxy-acide des carbones 1 et 2. Le produit de cette réaction, le 2-désoxyribose-4-phosphate, est stable envers le periodate. La courbe de vitesse de l'oxydation de l'acide glucométasaccharinique-5-phosphate reflète donc uniquement l'oxydation très lente d'un α -hydroxy-acide, tandis que les courbes de la réaction de l'acide glucométasaccharinique et de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate représentent l'oxydation du groupe α -hydroxy-acide, suivie de l'oxydation du produit de cette dernière réaction.

Les courbes obtenues, lors du titrage de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate et l'acide glucométasaccharinique par le periodate, ont des formes différentes. Cette différence est moins importante que celle qui existe entre ces deux courbes, d'une part, et la courbe de vitesse d'oxydation de l'acide glucométasaccharinique-5-phosphate, d'autre part. A notre avis la suroxydation de l'acide glucométasaccharinique est plus rapide que celle de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate à cause de l'influence autocatalytique des produits de cette réaction. L'oxydation du système α -glycol de l'acide glucométasaccharinique donne un équivalent d'acide formique, qui rend le milieu réactionnel plus acide. Contrairement, la consommation du periodate par le diol vicinal de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate ne détermine pas

la formation de produits acides. Le glycolaldéhyde phosphate, produit lors de la rupture du système glycolique de l'acide glucéto-saccharinique-6-phosphate, n'est pas attaqué par le periodate et joue le rôle de tampon envers l'acide formique, formé pendant l'oxydation du dialdéhyde malonique.

DEUXIEME PARTIE - PARTIE EXPERIMENTAL

CHAPITRE I

METHODES GENERALES

1.1 - Chromatographie sur papier

Pour chromatographier les phosphates des glucides préparés au cours de ce travail nous avons utilisé le papier Whatman No. 1. Nous avons employé la technique de la chromatographie ascendante. Les valeurs de Rf ne sont données qu'à titre indicatif, car les chromatogrammes n'étaient pas faits ni à temps, ni à température constants.

1.1.1 - Les solvants utilisés par nous sont les suivants :

Solvant A - pyridine : n-propanol : eau = 1 : 1 : 1

Solvant B - éthanol : eau : acide acétique = 78 : 20 : 2

Solvant C - n-propanol : ammoniacque concentré : eau = 7:1:2

Solvant D - n-butanol : acide acétique : eau = 4:1:5 (phase organique)

Nous n'avons pas énuméré d'autres solvants spéciaux pour certaines substances. Ceux-ci seront précisés au cours de la description de ces dernières.

1.1.2 - Les réactifs spécifiques pour révéler les substances séparées par la chromatographie sur papier sont les suivants :

1.1.2.1 - La présence du phosphore dans les substances est ainsi démontré : une solution aqueuse d'un volume de 100 ml. contenant 5 ml d'acide perchlorique à 60 %, 10 ml d'acide chlorhydrique 1 N et 25 ml du molybdate d'ammonium à 4 % est vaporisée sur le chromatogramme séché. Ensuite le papier est maintenu pendant 7

minutes à 85° et soumis à l'irradiation ultraviolette. Les substances contenant du phosphore apparaissent comme des taches bleues sur un fond incolore.

1.1.2.2 - La présence de sucres réducteurs est révélée à l'aide du phtalate de monoaniline. Le réactif est préparé par addition de 930 mg d'aniline et de 1,6 g d'acide phtalique à 100 ml du n-butanol saturé d'eau. Ce réactif est vaporisé sur le chromatogramme séché qui est ensuite séché 5 à 10 minutes à 105°. Les sucres réducteurs donnent des taches brunes de différentes nuances.

1.1.2.3 - Les composés contenant un système α -glycol sont détectés sur un chromatogramme à l'aide du périodate de sodium et de la benzidine. Une solution de 1 % de périodate de sodium dans l'eau est vaporisé sur le chromatogramme séché et 5 à 10 minutes plus tard une solution composée de 10 volumes de benzidine 0,1 M dans l'éthanol à 50 %, de 2 volumes d'acétone et d'un volume d'acide chlorhydrique 0,2 N est vaporisé sur le papier. Les substances contenant un système α -glycol donnent des taches incolores sur un fond bleu.

1.1.2.4 - Les lactones ou esters des acides carboxyliques sont identifiés sur les chromatogrammes de la façon suivante : un réactif composé d'un mélange de volumes égaux des solutions méthanoliques de chlorhydrate d'hydroxylamine 1 N et d'hydroxyde de potassium 1,1 N est vaporisé sur le chromatogramme séché. Dix minutes plus tard, une solution de chlorure ferrique à 1,5 % dans l'acide chlorhydrique à 1 % est vaporisée sur le papier. Les lactones apparaissent comme des taches mauves ou bleues sur un fond jaune.

1.1.2.5 - La présence de 2-désoxypentoses est démontrée à l'aide du réactif de DISCHE. Une solution de 1 g de diphénylamine et 2,75 ml d'acide sulfurique concentré dans 100 ml d'acide acétique est vaporisée sur le chromatogramme séché. Ensuite, le papier est placé entre deux plaques de verre et chauffé 10 minutes à 110°.

résines basiques Dowex 1 x 2 et Dowex 2 (200-400 mesh) sous forme de sels de différents acides. Avant chaque expérience les colonnes sont préparées de la façon suivante. (Le volume donné de la colonne est celui après le lavage final précédant l'adsorption de la substance).

1.5.1 - La colonne de formiate est préparée par lavage de la résine Dowex 2 par une solution de soude 1 N, par l'eau jusqu'à neutralité, ensuite par l'acide formique 1 N et finalement par l'eau jusqu'à neutralité.

1.5.2 - Pour préparer la colonne sous sa forme de sulfate, on lave la résine Dowex 2 avec de la soude 1 N, de l'eau jusqu'à neutralité, de l'acide sulfurique 1 N puis de l'eau jusqu'à neutralité.

1.5.3 - La colonne en sa forme de chlorure est préparée avec de la résine Dowex 1 x 2, lavée par une solution de soude 1 N, de l'eau jusqu'à neutralité, de l'acide chlorhydrique 1 N et finalement avec de l'eau jusqu'à neutralité.

1.5.4 - La préparation de la colonne de borate est effectuée par conversion d'une colonne de Dowex 1 x 2 sous sa forme de chlorure par lavage avec une solution de tétraborate de potassium 0,3 M jusqu'à la disparition de l'ion chlorure dans l'effluent et ensuite lavage à l'eau jusqu'à neutralité. Avant l'adsorption de la substance on lave la colonne par 100 ml d'une solution de tétraborate de potassium de 0,015 M.

1.5.5 - Les colonnes du cellulose ECTEOLA sont préparées par lavage de cet absorbant basique avec de la soude 1 N et ensuite avec de l'eau jusqu'à neutralité. Elles sont transformées en forme de bicarbonate par lavage avec du bicarbonate de potassium 1 N et ensuite avec de l'eau jusqu'à neutralité; la transformation en forme de carbonate s'effectue de la même manière en remplaçant la solution de bicarbonate par le carbonate de potassium 1 N.

1.6 - Révélation des phosphates de glucides dans les effluents des colonnes d'échangeurs d'ions

1.6.1 - Révélation du phosphate : On mesure dans un tube à essai gradué 0,5 ml de la fraction à doser et 0,2 ml de l'acide sulfurique concentré. Le tube est chauffé sur un bec de gaz jusqu'à l'évaporation de l'eau et l'apparition de fumées blanches d'anhydride sulfurique. Après refroidissement on ajoute dans le tube successivement 1 ml d'eau, 1 ml d'une solution de molybdate d'ammonium à 5 %, 0,5 ml d'une solution de sulfite de sodium à 20 % et 0,5 ml d'une solution d'hydroquinone à 0,5 %. On complète le contenu du tube à 10 ml par de l'eau. (Dans le cas de faibles taux de phosphate, le volume du tube est ajusté à 5 ml). La couleur formée est déterminée au bout d'une demi-heure dans un colorimètre de Metunier avec un écran ayant une absorption maximum à 590 m μ .

1.6.2 - Révélation des α hydroxyacides : On mesure dans un tube à essai 1 ml de la fraction à doser et on ajoute 6 ml de l'acide sulfurique concentré. Après refroidissement du mélange on ajoute dans le tube 0,1 ml d'une solution de p. hydroxydiphényl à 1,5 % dans la soude à 0,5 %. La couleur formée est déterminée au bout de 30 minutes dans un colorimètre de Neunier avec un écran ayant une absorption maximum à 560 m μ .

Les désoxypentoses donnent des taches bleues sur un fond incolore.

1.2 - Mise en évidence des fonctions acides des phosphates de glucides

1.2.1 - Titrages potentiométriques : On libère de son sel l'acide glycoside phosphorique à titrer par addition d'une résine échangeuse d'ions (Amberlite IR 120 sous sa forme acide). La solution acide est titrée par une solution d'hydroxyde de sodium 0,1 N. Les mesures de pH de la solution en cours de titrage sont effectuées à l'aide d'un pH-mètre Beckmann type G.

1.2.2 - Les titrages conductométriques ont été faits pour mettre en évidence les trois dissociations acides des phosphates des acides glucométasacchariniques. Avant le titrage, les sels de sodium des acides à titrer étaient chauffés à 80° en milieu fortement alcalin pour transformer les lactones en sels. La solution alcaline refroidie était titrée par une solution d'acide chlorhydrique 1 N. La résistivité de la solution en cours de titrage était mesurée à l'aide d'un conductimètre.

1.3 - Titrages des phosphates de sucres par le périodate de sodium

Dans une fiole jaugée de 25 ml on dissout 0,1 millimole de la substance à titrer dans une petite quantité d'eau. Dans le cas où il s'agit d'un sel de baryum on ajoute ensuite la quantité équivalente du sulfate de sodium. On ajoute 2,5 ml d'un tampon 1 N d'acide acétique et d'acétate de sodium de pH 3,2, 0,3 millimole de métapériodate de sodium et on complète immédiatement le volume à 25 ml par de l'eau. Pour certains titrages, la quantité de périodate ou les conditions de pH ont été changées. La solution est gardée à l'obscurité à la température ambiante. Comme témoin dans une autre fiole jaugée on prépare une solution analogue mais sans substance à doser. On prélève un échantillon de chacune de solutions que l'on dose ainsi :

Dans un Erlenmeyer de 25 ml, on mesure 5 ml d'une

solution 0,01 N d'arsénite de sodium, 5 ml d'une solution saturée de bicarbonate de sodium (9 %), 2,0 ml de la solution d'essai ou de la solution témoin et 0,5 ml d'une solution d'iodure de potassium à 20 %. On rince les parois du récipient à l'eau et on laisse reposer le mélange pendant 15 à 20 minutes. L'excès d'arsénite de sodium est dosé par une solution 0,01 N d'iode en utilisant le thiodène comme indicateur. On peut ainsi calculer la quantité de périodate n'ayant pas réagi. En se référant au témoin, on peut savoir la quantité de périodate consommée par la substance d'essai. Les dosages sont faits à intervalles réguliers pour que l'on puisse établir une courbe représentant la vitesse de la réaction de la substance avec le périodate de sodium.

1.4 - Pouvoir Rotatoire

Une quantité connue de la substance à doser est dissoute dans un volume connu d'un solvant approprié. Les mesures de la rotation sont effectuées avec un polarimètre de Zeiss, à lampe de sodium. Le pouvoir rotatoire est calculé par la formule suivante:

$$[\alpha]_D^t = \frac{100 \alpha}{c \times l}$$

où

α = rotation observée

c = concentration de la substance en g
par 100 ml de solution

l = longueur du tube polarimétrique en
décimètres

1.5 - Préparation des colonnes d'échangeurs d'ions pour les séparations des phosphates de glucides

Nous avons utilisé les colonnes d'échangeurs d'ions pour séparer les produits de la dégradation de RUFF, pour déterminer le rang d'éluion des acides α et β glucometasacchariniques 6 et 5 phosphates. Nous avons utilisé pour ces expériences les

nécessaire pour ouvrir le cycle époxyde du 1,2-isopropylidène-3-méthyl-5,6-anhydro-glucose est de 8 heures. Nous avons observé qu'il se forme, à côté du produit phosphorylé, aussi une autre substance ayant des valeurs Rf plus élevées et réagissant avec le periodate: elle est probablement le 1,2-isopropylidène-3-méthyl-glucose formé par hydrolyse de l'anhydrosucre. Nous avons éliminé les ions potassium du mélange réactionnel à l'aide de résine acide IR 120. Le phosphate inorganique était ensuite précipité par de la baryte et le sel de baryum amorphe du 1,2-isopropylidène-3-méthyl-glucose-6-phosphate isolé par concentration de la solution à sec. Le sel de baryum ainsi obtenu est débarrassé des dérivés glucidiques par lavage à l'éther et transformé en sel de cyclohexylammonium cristallin.

L'hydrolyse acide du 1,2-isopropylidène-3-méthyl-glucose-6-phosphate (XXVII) a fourni le 3-méthyl-glucose-6-phosphate, isolé sous forme de sel de baryum. La comparaison de cette substance avec le composé (XXI), obtenu par phosphorylation sélective du 1,2-isopropylidène-3-méthyl-glucose, confirma l'identité des deux corps. Par conséquent la structure (XXI) est correctement assigné à la substance synthétisée par phosphorylation sélective. Nous avons aussi comparé les acides glucométasaccharinique-6-phosphates (XXII) préparés par dégradation alcaline des 3-méthyl-glucose-6-phosphates obtenus par ces deux voies différentes. L'identité des acides obtenus prouve également l'identité des produits synthétisés par les deux voies.

Dégradation alcaline du 3-méthyl-glucose-6-phosphate.

Comme nous avons vu, la transformation des oses en acides sacchariniques exige un milieu fortement alcalin, qui rend possible l'ionisation du sucre et ensuite l'élimination d'un oxygène et le réarrangement de la structure. Pour effectuer cette réaction lors des premiers essais, on a utilisé des bases fortes à

des concentrations assez élevées. NEF a dégradé les glucides par la soude 8 N à chaud (56), PELIGOT (50), SCHEIBLER (51), KILIANI (54, 55, 60) et d'autres avaient effectué ces dégradations à l'aide de solutions saturées de chaux ou de baryte à la température ambiante. KENNER et RICHARDS (26, 27) dans leurs études sur le mécanisme et les conditions de la dégradation des oses substitués en 3, ont établi que la réaction a lieu déjà avec des bases diluées. Pour préparer l'acide glucométasaccharinique ils ont traité le 3-méthylglucose par une solution diluée de chaux.

Nos expériences préliminaires ont démontré que le produit formé lors du traitement alcalin du 3-méthylglucose-6-phosphate donne facilement un sel de baryum cristallin. Nous avons donc cherché à effectuer cette dégradation par la baryte dans des conditions permettant l'isolement immédiat du sel de baryum de l'acide formé. Pour nous assurer qu'avec la baryte on peut obtenir le même résultat qu'avec la chaux, nous avons répété la préparation de KENNER et RICHARDS en remplaçant la chaux par la baryte et nous avons obtenu, avec un rendement identique, le même produit. Nous avons également constaté que la dégradation du 3-méthylglucose phosphorylé peut être aussi bien réalisée à l'aide de baryte par traitement prolongé à la température ambiante que par chauffage en présence de la même base pendant une heure sur le bain-marie bouillant. Cependant, pour toutes nos dégradations nous avons utilisé le premier mode opératoire (à froid), car il nous semblait être moins à craindre du point de vue de la stabilité du résidu phosphorique. La dégradation alcaline des oses exige un excès assez grand de base minérale pour assurer l'ionisation de la molécule: condition essentielle de la réaction. Dans nos préparations nous avons utilisé environ trois équivalents de baryte par mole de sucre. La réaction terminée, l'élimination de cet excès de base était effectuée à l'aide de résine Amberlite IR 120. Nos essais pour parvenir au même but, en précipitant les ions de baryum sous forme de carbonate, n'ont pas donné les résultats attendus: le rendement du produit de

CHAPITRE II

SYNTHESES DES PHOSPHATES DU GLUCOSE

2.1 - Synthèse du 3-O-méthyl D-glucose-6-phosphate

2.1.1 - 1,2:5,6- di-O-isopropylidène D-glucofuranose

A 100 g de glucose anhydre finement pulvérisé, en suspension dans 2000 ml d'acétone anhydre, on ajoute rapidement 120 g de chlorure de zinc fondu et un mélange de 20 g de pentoxyde de phosphore et 40 g d'acide phosphorique à 85 %. Le mélange est agité mécaniquement jusqu'à la dissolution du glucose (durée 3 à 4 heures). On laisse la solution ainsi obtenue jusqu'au lendemain. On la refroidit et l'ajoute à une suspension aqueuse de carbonate de sodium froide; la solution doit rester toujours alcaline. Le carbonate de zinc précipité est séparé par filtration et lavé à l'acétone. Le filtrat et l'acétone de lavage sont réunis. On chasse l'acétone sous vide et extrait la solution aqueuse qui reste par de l'éther. On sèche la couche étherique sur le sulfate de sodium et on réduit le volume de la solution à 100 ml: la substance cristallise. On essore les cristaux le lendemain et les lave avec de l'hexane contenant 5 % d'éther. Rendement 100 g. F. 105-106°.

2.1.2 - 1,2 : 5,6 di-O-isopropylidène-3-O-méthyl-D-glucofuranose

Dans un ballon muni d'un agitateur mécanique, d'un réfrigérant et d'une ampoule à brome, on chauffe à 45° un mélange de 78 g de 1,2 : 5,6 di-O-isopropylidène D-glucose, 75 ml d'acétone et 32 g de soude pulvérisée. 42,6 ml de diméthyl sulfate sont ajoutés goutte à goutte, la température étant maintenue à 45°. Il faut environ 90 minutes pour ajouter le réactif. Pendant les 90

minutes suivantes, le mélange réactionnel est chauffé à 50° et finalement 3 heures à 55-60°. Le mélange réactionnel est dilué avec de l'eau et le produit extrait avec du chloroforme. On lave la couche chloroformique par de l'eau et chasse le solvant sous vide. Le résidu jaune est soumis à la distillation fractionnée. Le 1,2 : 5,6-di-0-isopropylidène-3-0-méthyl-D-glucofuranose distille entre 81-82° à 0,07 mm Hg de pression. Rendement 71 g.

2.1.3 - 1,2-0-isopropylidène-3-0-méthyl-D-glucofuranose

On dissout 55 g du 1,2 : 5,6-di-0-isopropylidène-3-0-méthyl-D-glucofuranose dans un mélange de 202 ml d'acide acétique et 120 ml d'eau. La solution est maintenue 5 heures et demi à 38°. On chasse l'acide acétique et l'eau sous vide. Le résidu qui a la consistance d'un sirop est soumis à la distillation fractionnée. Le 1,2-0-isopropylidène-3-0-méthyl-D-glucofuranose distille entre 118-120° à la pression de $5,22 \cdot 10^{-3}$ mm Hg. Rendement 40 g.

2.1.4 - 3-0-méthyl-D-glucose-6-phosphate

On ajoute 11,5 g du diphenylphosphorochloridate à une solution de 9,1 g de 1,2-0-isopropylidène-3-0-méthyl-D-glucofuranose dans 50 ml de benzène anhydre . 10 ml de pyridine anhydre sont ajoutés goutte à goutte, en agitant mécaniquement le mélange réactionnel, qui chauffe légèrement. Au bout de deux heures, on sépare le chlorhydrate de pyridinium formé par filtration et on lave le précipité par du benzène anhydre. On fait traverser la solution benzénique ainsi obtenue successivement par trois colonnes de résines échangeuses d'ions préparées de la façon suivante : La première colonne est remplie de résine acide - Amberlite IR 120. Après l'avoir transformée en forme d'acide libre, on lave la colonne par de l'éthanol jusqu'à l'élimination complète de l'eau dans l'effluent et ensuite par du benzène anhydre jusqu'à la disparition d'alcool de la colonne. La seconde colonne est préparée à partir de la résine basique Amberlite 45 qui est transformé en sa forme de base libre par lavage avec de la soude 2 N, ensuite

par de l'eau jusqu'à neutralité et puis elle est lavée par de l'éthanol et du benzène de la même manière que la première colonne. La troisième colonne est préparée de la résine acide Amberlite IR 120 d'exactlyment la même façon que la première colonne.

La solution benzénique éluée de la dernière colonne est concentrée sous vide. On dissout le résidu huileux dans 50 ml d'éthanol absolu et on évapore cette solution sous vide. Le résidu est ensuite dissout dans 300 ml d'éthanol absolu et soumis à l'hydrogénation catalytique.

On réduit par l'hydrogène 500 mg d'oxyde de platine suspendus dans 15 ml d'éthanol absolu, on y ajoute la solution préparée comme il est décrit ci-dessus, on rince le récipient deux fois avec 50 ml du même solvant, en ajoutant ce dernier dans la solution à hydrogéner que l'on secoue ensuite dans une atmosphère d'hydrogène à la température et pression normales. Quand la quantité calculé d'hydrogène est absorbée, on essore le catalyseur et classe l'éthanol de la solution acide sous vide, en ajoutant de l'eau au fur et à mesure pour obtenir, finalement, 250 ml de solution aqueuse.

Cette solution est chauffée 20 minutes sur le bain-marie bouillant. Après refroidissement on neutralise (à pH 6,5) par de la baryte saturée. Ensuite on concentre sous vide à un petit volume et cristallise le produit par addition d'acétone. Rendement: 9,5 g.

Calculé pour $C_7H_{13}O_9Pb \cdot 0,5H_2O$ = 418

C% = 20,03; H% = 3,35; $OCH_3\%$ = 7,42

Trouvé C% = 20,31; H% = 3,86; $OCH_3\%$ = 7,55

$[\alpha]_D^{22} = +26,1$ (c = 1,75 dans l'eau)

On prépare une colonne de résine Amberlite IR 120 sous forme de cyclohexylamine et on fait traverser cette colonne par une solution de 2 g de sel de baryum de 3-O-méthyl - glucose -

6-phosphate dans 50 ml. d'eau. L'éluant est concentré sous vide et le résidu cristallisé dans un mélange d'éthanol-éther. Rendement: 1,7 g.

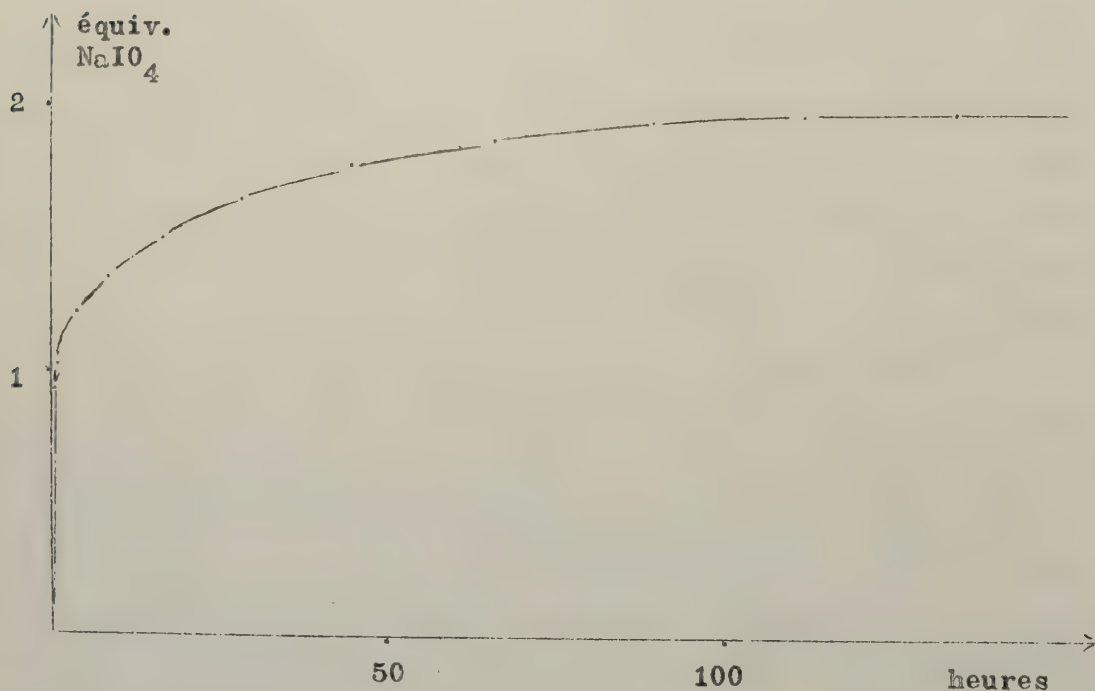
Calculé pour $C_{19}H_{41}N_2P = 472$

C% = 48,30 H% = 8,68 N% = 5,93 P% = 6,56

Trouvé

C% = 48,10 H% = 8,65 N% = 5,90 P% = 6,54

Les Rf sont les suivants: Solvant A 0,49; Solvant C 0,11; Solvant D 0,09. Le sel de baryum du 3-méthyl-glucose-6-phosphate réagit avec deux équivalents de periodate de sodium.



2.2 - Synthèse du 3-0-méthyl D-glucose-6-phosphate authentique.

2.2.1 - 1,2-0-isopropylidène-3-0-méthyl-6-0-tosyl-glucose.

On ajoute 10 g. de chlorure de l'acide p-toluènesulfonique dissous dans 50 ml. de chloroforme à une solution de 12 g. de isopropylidène-3-méthyl-glucose dans 50 ml. de chloroforme an-

hydre et exempt d'alcool. On refroidit la solution ainsi obtenue dans un mélange de neige carbonique et d'acétone et on ajoute, goutte à goutte, 12 ml. de pyridine anhydre en agitant à la main. La température du mélange réactionnel doit rester inférieure à -15° . Après avoir ajouté toute la pyridine, on laisse le mélange dans le bain froid afin d'atteindre lentement la température ambiante. Le lendemain on chasse le solvant sous vide; le résidu huileux est repris par le chloroforme et cette solution lavée successivement par l'eau, l'acide sulfurique à 1%, l'eau, une solution de bicarbonate de sodium à 1% et finalement par l'eau jusqu'à neutralité. La couche chloroformique est séchée sur du sulfate de sodium et évaporée sous vide. Le rendement du produit brut est 16 g.

2.2.2 - 1,2-0-isopropylidène 3-0-méthyl 5,6-anhydro-glucose.

16 g. de 1,2-isopropylidène 3-méthyl 6-tosyl-glucose (2.2.1) sont dissous dans 35 ml. de chloroforme anhydre et la solution refroidie dans un bain de mélange d'acétone et de neige carbonique. On y ajoute, vite et en agitant, une solution froide de méthylate de sodium, préparée par dissolution d'un gr. de sodium dans 12 ml. de méthanol anhydre. On abandonne le mélange réactionnel pendant 15 minutes: il devient gélatineux. Ensuite on ajoute 20 ml. d'eau et sépare la couche chloroformique. La couche aqueuse est extraite 3 fois par du chloroforme, les solutions chloroformiques réunis et lavés à l'eau jusqu'à neutralité et ensuite séchés sur du sulfate de sodium. Après avoir chassé le solvant on distille le résidu sous vide. Le 1,2-isopropylidène 3-méthyl 5,6-anhydro-glucose distille à $66-68^{\circ}$ sous 0,01 mm. Rendement 6,5g.

2.2.3 - 1,2-0-isopropylidène 3-0-méthyl- β -glucofuranose-6-phosphate

On ajoute 6,5 g. de isopropylidène-3-méthyl-5,6-anhydro-glucose à une solution de 15 g. de phosphate bipotassique dans 80 ml. d'eau. Le mélange hétérogène est chauffé au bain-marie bouillant à reflux. Au bout de sept heures il devient homogène et brunâtre. On le refroidit et on élimine les ions potassium par ad-

dition d'un excès de résine acide Amberlite IR 120. On sépare la résine par filtration et la lave avec de l'eau. Le filtrat et les eaux de lavage sont réunis et neutralisés par la baryte. On essore le précipité de phosphate de baryum, on le lave avec un peu d'eau froide et on concentre le filtrat sous vide jusqu'à un volume de 100 ml. On fait passer la solution ainsi obtenue à travers une colonne contenant environ 50 ml de la résine échangeuse d'ions Amberlite IR 120 sous sa forme de cyclohexylammonium. L'effluent de la colonne est évaporé à sec sous vide et le résidu cristallisé dans un mélange contenant 60% d'isopropanol et 40% d'acétone. Le produit est cristallisé une deuxième fois dans un mélange d'isopropanol:acétone 1:1. F. 126-127°. Rendement: 4,5 g.

Calculé pour $C_{16}H_{30}O_9NP$ = 413

C% = 46,95; H% = 7,27; N% = 3,39; OCH_3 = 7,49.

Trouvé C% = 47,01; H% = 8,23; N% = 3,82; OCH_3 = 7,81.

$[\alpha]_D^{22} = -21,5^\circ$ (c = 2,0 dans l'eau)

Les Rf sont les suivants: Solvant A: 0,81; Solvant C: 0,42; Solvant D: 0,71.

2.2.4 - 3-0-méthyl D-glucose-6-phosphate.

3,3 g de sel de cyclohexylammonium du 1,2-isopropylidène-3-0-méthyl glucose-6-phosphate sont transformés en acide libre par addition d'un excès de la résine Amberlite IR 120, sous sa forme acide. On sépare la résine par filtration et on la lave avec de l'eau. Le filtrat et les eaux de lavage sont réunis. La solution acide, dont le volume est 120 ml est ensuite chauffée 15 minutes au bain-marie bouillant. Après refroidissement on la neutralise par la baryte (pH 7) et on la concentre sous vide à froid. Le sel de baryum du 3-0-méthyl glucose-6-phosphate est précipité par addition d'éthanol. Rendement: 2,4 g.

Les Rf du produit et les résultats de son titrage avec le

périodate de sodium sont identiques à ceux obtenus auparavant (2.1.4).

2.3 - Synthèse du D-glucose-3,6-phosphate cyclique

2.3.1 - 1,2-0-isopropylidène-6-0-acétyl-D-glucofuranose

Un mélange de 150 g. de glucose anhydre, 3,0 l. d'acétone anhydre, 51,6 g. d'acide borique et 60 ml. d'acide sulfurique concentré est agité pendant 16 heures. On neutralise la solution formée par du carbonate de sodium, puis on sépare le précipité par filtration et concentre la solution sous vide. On ajoute au résidu 210 ml. d'anhydride acétique et 80 ml. de pyridine. On tempère la réaction violente quand la solution devient de couleur foncée et on laisse reposer 16 heures. On ajoute ensuite 1200 ml. d'eau et on extrait la solution aqueuse 15 fois avec 100 ml. de tétrachlorure d'acétylène. La couche organique est lavée avec une solution de bicarbonate de sodium jusqu'à neutralité, puis à l'eau et enfin séchée sur sulfate de sodium. On la décolore par du noir animal et concentre la solution filtrée sous vide. Le résidu cristallise spontanément. On recristallise le produit dans 150 ml. d'acétate d'éthyle. Rendement 60 g. F 147-148°.

2.3.2 - 1,2-0-isopropylidène-6-0-acétyl-D-glucofuranose-3,5-dinitrate

Une suspension de 26,2 g. du 1,2-0-isopropylidène-6-0-acétylglucofuranose dans 65 ml. d'anhydride acétique est refroidie à -50°. On y ajoute un mélange de 16,6 ml. d'acide nitrique concentré (densité = 1,52) et 65 ml. d'anhydride acétique refroidi à -40°. On maintient la température du mélange réactionnel entre -50° et -10° jusqu'à ce que le tout soit dissous, et ensuite entre -20° et -10° pendant une heure. On le refroidit alors à -50° et on y ajoute 250 ml. de chloroforme à -50°. La solution chloroformique est versée très lentement dans une solution de 400 g. de carbonate de potassium dans 1400 ml. d'eau glacée contenant 200 g. de glace pilée. Quand la solution chloroformique est neutre, on la sépare

de la couche aqueuse, la lave à l'eau et la sèche sur sulfate de sodium. On chasse le chloroforme sous vide et cristallise le résidu dans 100 ml. d'éthanol. Rendement 34 g. F. 81-82°.

2.3.3 - 1,2-0-isopropylidène D-glucofuranose-5-nitrate

On dissout 34 g. du 1,2-0-isopropylidène-6-0-acétyl-D-glucofuranose-3,5-dinitrate dans 40 ml. de benzène anhydre et on y ajoute 67 ml. d'une solution éthanolique à 30 % de diméthylamine. On laisse reposer le mélange pendant 24 heures. Ensuite les solvants sont chassés sous vide et les dernières traces de substances volatiles sont enlevées à 100° sous 0,1 mm. de Hg de pression. On dissout le résidu dans du benzène et on extrait la solution benzénique plusieurs fois à l'eau. La solution aqueuse ainsi obtenue est décolorée par le noir animal et concentrée à un petit volume. L'hydrate du 1,2-0-isopropylidène glucofuranose-5-nitrate cristallise spontanément. On le filtre, le lave avec un peu d'eau froide et on le sèche dans un dessiccateur. Rendement 12 g. F. 86-87°.

L'hydrate ainsi obtenu est dissous dans 200 ml. de benzène anhydre. On concentre la solution benzénique sous la pression atmosphérique jusqu'à un volume de 80 ml. Le produit anhydre cristallise après refroidissement de la solution. Rendement 10 g. F. 107,5-108°.

2.3.4 - 1,2-0-isopropylidène-D-glucofuranose-5-nitrate-3,6-phénylphosphate

4,8 g. du produit précédent (2.3.3) sont dissous dans 40 ml. de pyridine anhydre. On y ajoute ensuite 3,66 g. de monophénylphosphorodichloridate dans 10 ml. de pyridine et on laisse la solution réagir pendant 72 heures à 37° sous la tension de vapeur du solvant. On ajoute 10 ml. d'eau et au bout de deux heures on chasse la pyridine sous vide et on reprend le résidu dans du chloroforme. La solution chloroformique est lavée à l'eau et séchée sur sulfate de sodium. Après avoir chassé le chloroforme sous vide on obtient le produit comme un résidu huileux.

2.3.5 - 1,2-0-isopropylidène-D-glucofuranose-3,6-phosphate cyclique

On dissout 3,9 g. du produit précédent (2.3.4) dans 56 ml. de dioxanne et on ajoute 5,57 ml. d'une solution de potasse 2 N. L'huile qui sépare au début se dissout quand on secoue le mélange. Au bout de 16 heures de secouage à la température ambiante, on neutralise la solution avec la résine IR 120 sous sa forme acide. La résine est séparée par filtration et la solution aqueuse concentrée sous vide. On reprend le résidu dans de l'eau et on lave la solution aqueuse à l'éther. On fait passer la couche aqueuse très lentement à travers une colonne de l'IR 120 sous sa forme de sel de cyclohexylammonium et on concentre l'effluent sous vide. Le résidu est cristallisé dans 70 ml. d'éthanol à 95 %. Rendement 2,4 g. F. 197-205° avec décomposition.

2.3.6 - 1,2 : 5,6-di-0-isopropylidène-D-glucofuranose-3-diphénylphosphate

On dissout 3,9 g. du 1,2 : 5,6-0-diisopropylidène glucofuranose (2.1.1) dans 25 ml. de pyridine anhydre, on y ajoute 12 g. de diphénylphosphorochloridate et on laisse le mélange réactionnel à 37° pendant deux jours sous la tension de vapeur du solvant. On ajoute ensuite 2 ml. d'eau et, au bout d'une demi-heure on chasse les solvants sous vide. Le résidu est dissous dans du chloroforme et lavé à l'eau glacée, avec une solution glacée d'acide sulfurique à 1 % jusqu'à ce que la couche aqueuse reste acide et finalement à l'eau. La solution chloroformique est séchée sur le sulfate de sodium, séparée de ce dernier par filtration et évaporée sous vide. Le di-0-isopropylidène glucose-3-diphénylphosphate reste comme une huile.

2.3.7 - 1,2-0-isopropylidène-D-glucofuranose-3-phosphate

La substance huileuse précédente est dissoute dans 80 ml. d'éthanol et réduite par l'hydrogène en présence de platine d'Adams, qui a été préparé préalablement par hydrogénation d'une suspension de 0,5 g. d'oxyde de platine dans 20 ml. d'éthanol

absolu. Quand la quantité calculée d'hydrogène a été absorbée, on sépare la solution éthanolique du catalyseur et on la neutralise par une solution alcoolique de cyclohexylamine. On chasse les solvants sous vide, reprend le résidu dans la quantité minimum d'eau et on cristallise le produit par addition d'acétone. Rendement 9,6 g. F; 158-164° (avec décomposition).

2.3.8 - 1,2-0-isopropylidène-D-glucofuranose-3,6-phosphate cyclique

2.3.8.1 - A partir du 1,2-0-isopropylidène glucofuranose-5-nitrate-3,6-phénylphosphate :

On dissout 4 g. de cette substance de départ (2.3.4) dans 20 ml. d'éthanol absolu et on la réduit par l'hydrogène en présence de platine d'Adams, préparé préalablement par hydrogénation de 0,4 g. d'oxyde de platine suspendu dans 10 ml. du même solvant. Quand la quantité calculée d'hydrogène a été absorbée, on sépare le catalyseur par filtration et on concentre la solution éthanolique sous vide. Le résidu est trituré avec de l'éther pour le rendre cristallin. Le sel d'ammonium du 1,2-0-isopropylidène glucofuranose 3,6-phosphate cyclique ainsi obtenu est recristallisé dans un mélange d'éthanol-éther éthylique. Rendement 2,1 g. F. 160-170° avec décomposition.

2.3.8.2 - A partir du 1,2-0-isopropylidène glucofuranose 3,6-phosphate cyclique :

On dissout 1,9 g. de sel de cyclohexylammonium du 1,2-0-isopropylidène glucofuranose-5-nitrate 3,6-phosphate cyclique (2.3.5) dans 50 ml. d'eau et on le réduit avec l'hydrogène en présence de palladium, qui a été préalablement préparé par hydrogénation de 0,2 g. d'oxyde de palladium suspendu dans 10 ml. d'eau acidifiée par 0,24 ml. d'acide acétique. Quand la quantité calculée d'hydrogène a été absorbée, on sépare le catalyseur par filtration et on concentre la solution aqueuse sous vide. On reprend le résidu dans de l'éthanol et on cristallise le produit par l'addition de l'éther. Rendement du sel de cyclohexylammonium du

1,2-0-isopropylidène glucofuranose 3,6-phosphate cyclique 1,4 g.

2.3.8.3 - Par la cyclisation du 1,2-0-isopropylidène glucofuranose-3-phosphate :

8,5 g. de sel de cyclohexylammonium du 1,2-0-isopropylidène glucofuranose-3-phosphate (2.3.7) sont dissous dans 50 ml. d'eau et transformés en acide libre par addition d'un excès de la résine IR 120 sous sa forme acide. On sépare l'échangeur d'ions par filtration et on neutralise la solution obtenue par la pyridine. On évapore l'eau sous vide et on dissout le résidu dans 48 ml. du même solvant. On ajoute ensuite une solution de 25,5 g. du dicyclohexylcarbodiimide (DCC) dans 190 ml. de pyridine et on secoue le mélange réactionnel pendant 4 jours à la température ambiante. Ensuite le mélange réactionnel est dilué par 250 ml. d'eau. On sépare le dicyclohexylurée formée par filtration et on concentre la solution sous vide. Le résidu est repris dans de l'eau, acidifié par addition d'un excès d'IR 120 et, après filtration, neutralisé par une solution éthanolique de cyclohexylamine. On chasse les solvants sous vide, reprend le résidu dans de l'éthanol et cristallise le sel de cyclohexylammonium du 1,2-0-isopropylidène glucofuranose 3,6-phosphate cyclique par addition d'éther. Rendement 5,5 g.

2.3.9 - D-glucose 3,6 phosphate cyclique

5,5 g. du sel d'ammonium du 1,2-0-isopropylidène glucofuranose 3,6-phosphate cyclique (2.3.8.1) ou la quantité équivalente de son sel de cyclohexylammonium (2.3.8.2; 2.3.8.3), sont dissous dans 75 ml. d'eau. On fait passer cette solution à travers une colonne contenant 100 ml. environ de résine Amberlite IR 120 sous sa forme acide en récoltant 200 ml. d'effluent. La solution ainsi obtenue est chauffée pendant 15 minutes au bain-marie bouillant. Après refroidissement, on la neutralise par la baryte et la concentre sous vide jusqu'à un volume de 12 ml. L'addition d'éthanol provoque la précipitation d'une huile qui cristallise pendant la trituration. Rendement du sel de baryum du glucose 3,6 phosphate cyclique 3,7 g.

$$[\alpha]_D^{21} = + 25,5^{\circ} \text{ (c= 2,0 dans l'eau)}$$

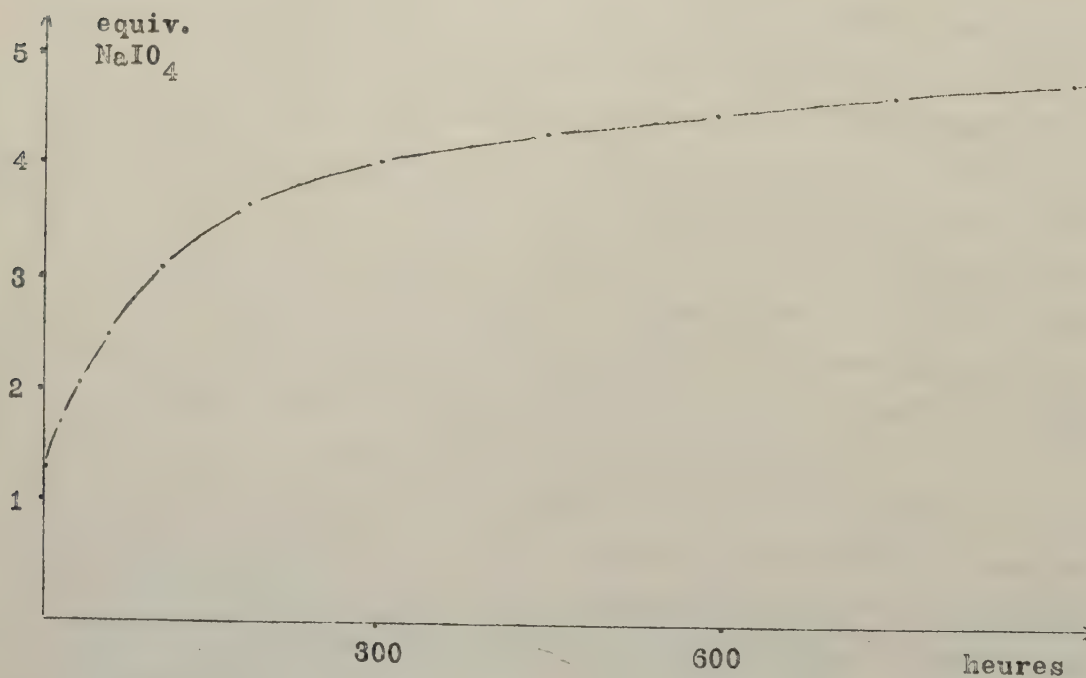
Calculé pour $C_6H_{10}O_8P Ba \frac{1}{2} \cdot H_2O = 345,5$

C% = 20,84 H% = 4,05

Trouvé C% = 20,99 H% = 4,07

Les Rf sont les suivants : Solvant A 0,53; Solvant D 0,12.

Les résultats du titrage de glucose 3,6 phosphate cyclique par un excès de périodate de sodium (0,7 ml) sont démontrés par la courbe ci-dessous.



2.4 - Synthèse du D-glucose 3,5-phosphate cyclique

2.4.1 - 1,2-O-isopropylidène D-glucofuranose

On secoue un mélange de 50 g. de glucose, 1000 ml. d'acétone, 17,2 g. d'acide orthoborique et 20 ml. d'acide sulfurique concentré jusqu'à ce que le tout soit dissous. Ceci demande 12-16 heures. La solution est ensuite neutralisée par du carbonate de sodium et les solvants sont chassés sous vide. On ajoute du méthano-

nol au résidu et on distille le mélange. Quand il n'y a plus d'ester borique distillant avec le méthanol, le résidu est cristallisé dans de l'éthanol. Rendement 35-40 g. F. 159°.

2.4.2 - 1,2-0-isopropylidène-6-0-tosyl-D-glucofuranose.

On dissout 27 g. de 1,2-isopropylidène glucofuranose dans 200 ml. de pyridine anhydre et on refroidit la solution à -15° dans un bain de neige carbonique et d'acétone. On ajoute à cette solution 23,5 g de chlorure de l'acide p-toluènesulfonique dissous dans 180 ml de chloroforme sec. La vitesse d'addition est réglée de telle sorte que la température du mélange ne dépasse jamais - 10°. On laisse le mélange réactionnel reposer jusqu'au lendemain. Ensuite, on chasse les solvants sous vide à froid, on reprend le résidu dans du chloroforme et on lave la solution chloroformique à l'eau, par une solution d'acide sulfurique de 1% et, finalement, à l'eau jusqu'à neutralité. On sèche la couche chloroformique sur du sulfate de sodium et on chasse le solvant sous vide. Le résidu cristallise spontanément. Rendement 24 g. F. 108°.

2.4.3 - 1,2-0-isopropylidène-5,6-anhydro-glucofuranose.

10 g du 1,2-isopropylidène-6-tosyl-glucofuranose sont dissous dans 24 ml de chloroforme sec et refroidis dans un bain de neige carbonique - acétone. On y ajoute, en agitant, une solution de méthylate de sodium, préparée par dissolution de 0,75 g de sodium dans 15 ml de méthanol anhydre. Le mélange réactionnel, qui devient gélatineux, reste pendant 5 à 10 minutes dans le bain refroidissant. On ajoute ensuite 15 ml d'eau et on sépare la couche chloroformique. La couche aqueuse est extraite trois fois par du chloroforme. Les solutions chloroformiques sont réunies et séchées sur du sulfate de sodium. On chasse ensuite le chloroforme et on cristallise le résidu dans le benzène. Rendement: 4 g. F. 133-134°.

2.4.4 - 1,2-0-isopropylidène-6-0-benzyl-D-glucofuranose.

5 g de 1,2-isopropylidène-5,6-anhydro-glucofuranose sont dissous dans une solution de benzylate de sodium, qui est préparée préalablement par addition de 0,5 g de sodium métallique à 100 ml d'alcool benzylique fraîchement distillé. On abandonne le mélange réactionnel pendant trois jours à la température ambiante. Ensuite, la solution est extraite deux fois par de l'eau. On ajoute de la potasse concentrée à la solution aqueuse que l'on extrait par de l'éther. Les solutions dans l'alcool benzylique et l'éther sont réunies, séchées sur sulfate de sodium et les solvants chassés sous vide faible et finalement sous vide poussé. Le résidu est repris dans l'acétate d'éthyle et recristallisé par addition d'éther de pétrole. F. 78,5-79°.

2.4.5 - 1,2-isopropylidène-6-0-benzyl-D-glucofuranose-3,5-phénylphosphate.

On ajoute 2,1 g de monophénylphosphorodichloridate à une solution de 3,1 g de 1,2-isopropylidène-6-benzyl-glucofuranose dans 35 ml de pyridine anhydre. Le mélange réactionnel est abandonné 12 heures à 37° sous la pression de vapeur du solvant. On chasse la pyridine sous vide et on triture le résidu plusieurs fois avec de l'eau glacée. On reprend le résidu dans de l'éther et on lave la solution étherique par de l'acide sulfurique à 1%, puis à l'eau et ensuite on la sèche sur du sulfate de sodium. Après avoir chassé le solvant sous vide, on obtient 3,8 g. d'une huile transparente.

2.4.6 - 1,2-0-isopropylidène-6-0-benzyl-D-glucofuranose-3,5-phosphate.

3,8 g de 1,2-isopropylidène-6-benzyl-glucofuranose-3,5-phénylphosphate sont dissous dans 50 ml de dioxane et on y ajoute 6,5 ml d'une solution de potasse 2 N. Une huile se sépare dans le mélange réactionnel. On le secoue mécaniquement. Au bout d'une demi-heure la solution devient homogène. On la laisse reposer 16 heures,

ensuite on la neutralise par de la résine Amberlite IR 120 sous sa forme acide. On sépare la résine par filtration et on la lave avec de l'eau. On chasse les solvants sous vide et on reprend le résidu dans de l'eau. La solution aqueuse est lavée deux fois à l'éther et passée, très lentement, à travers une colonne de IR 120 sous sa forme de sel de cyclohexylammonium. On chasse l'eau de l'effluent et on reprend le résidu dans de l'éthanol. On cristallise le sel de cyclohexylamine du 1,2-isopropylidène-6-benzyl-glucofuranose-3,5-phosphate cyclique par addition d'éther. Rendement, après une recristallisation: 2,8 g. F. 185-200° avec décomposition.

2.4.7 - 1,2-0-isopropylidène-D-glucofuranose-3,5-phosphate.

On dissout 1 g de sel de cyclohexylammonium du 1,2-isopropylidène-6-benzyl-glucofuranose-3,5-phosphate dans 30 ml d'éthanol absolu et on secou la solution dans une atmosphère d'hydrogène en présence de palladium, préparé préalablement par l'hydrogénation d'une suspension de 0,2 g d'oxyde de palladium dans 10 ml d'éthanol absolu. Quand la quantité calculée d'hydrogène a été absorbée, on sépare le catalyseur par filtration et on concentre la solution éthanolique sous vide. Le résidu est cristallin. On le dissout dans l'éthanol et on cristallise par addition d'éther. Rendement du sel de cyclohexylammonium du 1,2-isopropylidène-glucofuranose-3,5-phosphate: 0,6 g. F. 180-190° avec décomposition.

2.4.8 - D-glucose-3,5-phosphate cyclique.

7,5 g du sel de cyclohexylammonium du 1,2-isopropylidène-glucofuranose-3,5-phosphate cyclique sont dissous dans 75 ml d'eau. La solution aqueuse est passée à travers une colonne contenant 100 ml de résine Amberlite IR 120 sous sa forme acide. L'effluent est ajusté à un volume de 200 ml et chauffé pendant 15 minutes au bain-marie bouillant. Après refroidissement, il est neutralisé par de la baryte et concentré à sec sous vide. On reprend le résidu dans une petite quantité d'eau et cristallise la substance par addition d'é-

thanol. Rendement du sel de baryum du glucose-3,5-phosphate cyclique: 3,9 g.

Calculé pour $C_6H_{10}O_8PBa_{0,5} \cdot H_2O = 328$

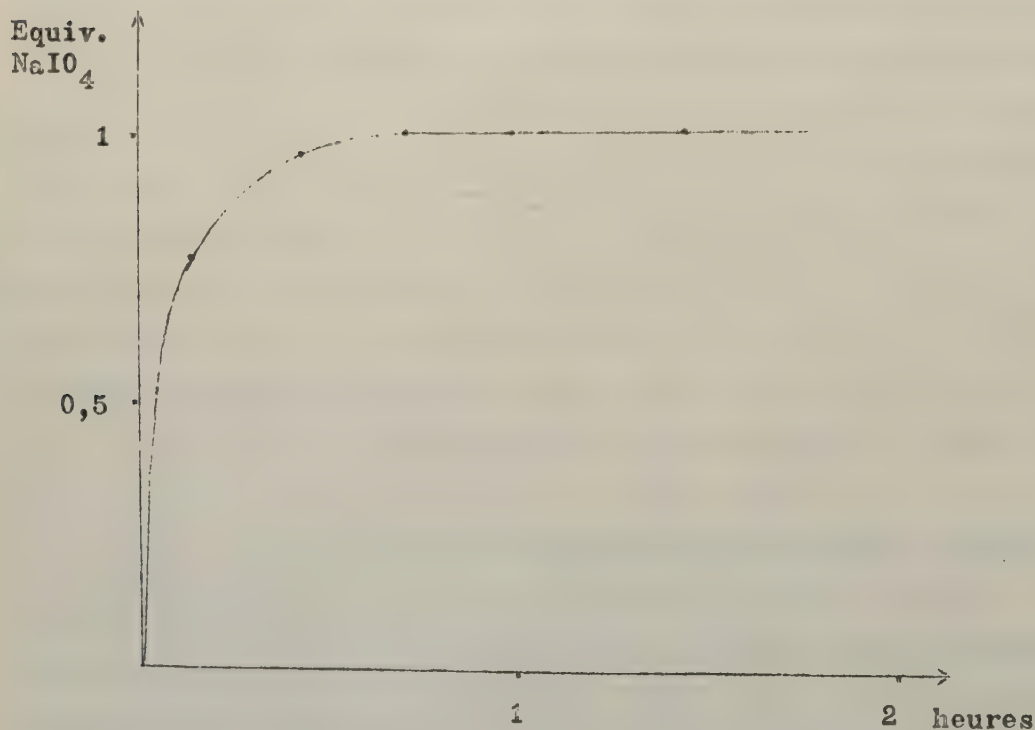
C% = 21,95; H% = 3,66.

Trouvé C% = 22,17; H% = 3,83.

$[\alpha]_D^{21} = +20,7^\circ$ (c = 2, dans l'eau)

Les valeurs Rf sont les suivantes: Solvant A : 0,65;
Solvant C : 0,39; Solvant D : 0,37.

Le glucose-3,5-phosphate cyclique réagit avec un équivalent de periodate de sodium.



CHAPITRE III.

Dégradations alcalines des phosphates de glucose.

3.1 - Synthèse de l'acide glucométasaccharinique

3.1.1 - 3-0-méthyl D-glucose

A 8,3 g. du 1,2 : 5,6-di-0-isopropylidène-3-0-méthyl D-glucose on ajoute 20 ml. d'eau ajustée à pH 2,6 avec de l'acide sulfurique. Le mélange est chauffé à reflux pendant 6 heures. Ensuite il est décoloré par du noir animal et la solution aqueuse concentrée sous vide. Les dernières traces d'eau sont enlevées par évaporation répétée avec de l'éthanol. Le résidu partiellement cristallin est recristallisé dans du méthanol. Le lendemain, on essore les cristaux, on les lave avec un peu de méthanol froid et on les sèche dans un dessiccateur. Rendement 5,2 g. F. 166-168°.

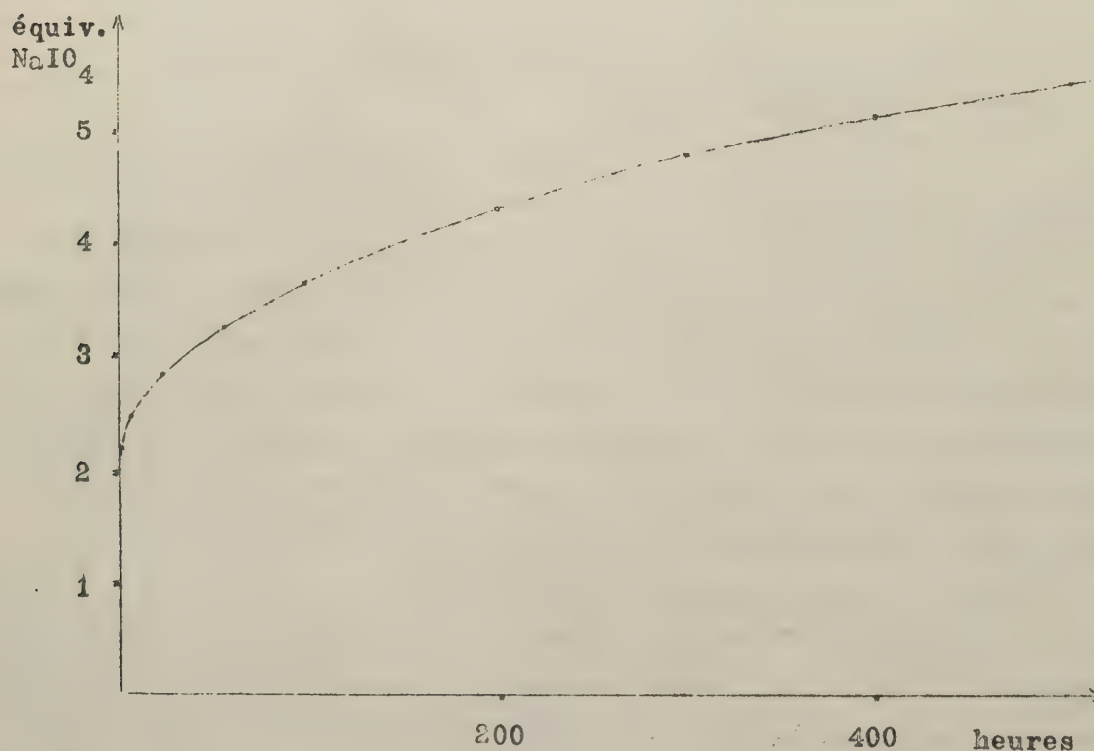
3.1.2 - Acide glucométasaccharinique

5 g. du 3-0-méthyl D-glucose sont dissous dans 400 ml. de baryte 0,3 N et le mélange réactionnel est laissé 2 jours à la température ambiante. La solution jaunit et ensuite verdit légèrement puis elle redevient incolore.

On acidifie la solution par addition de la résine IR 120 sous sa forme acide. On sépare la résine par filtration et on neutralise la solution avec de la chaux jusqu'à pH 7,5. Ensuite, on la concentre jusqu'à un faible volume et la décolore avec du noir animal. La solution est reconcentrée pour donner un sirop que l'on triture avec du méthanol. On essore les cristaux formés et les redissout dans un peu d'eau. On ajoute du méthanol à la solution jusqu'à ce qu'elle devienne turbide et on laisse cristalliser. Rendement 4,2 g.

Les valeurs Rf sont les suivantes: Solvant A acide - 0,48, lactone - 0,72; Solvant C 0,51.

Les résultats obtenus par titrage du sel de baryum de l'acide glucométasaccharinique avec un excès de périodate de sodium dans une solution non tamponnée sont représentés par la courbe ci-dessous.



3.1.3 - Anilide de l'acide glucométasaccharinique

1 g. du sel de calcium de l'acide glucométasaccharinique est dissous dans la quantité minimum d'eau et acidifié par addition d'Amberlite IR 120 sous sa forme acide. La résine est ensuite séparée par filtration et la solution concentrée à sec sous vide. Le résidu sirupeux est dissous dans 0,5 ml. d'éthanol. On y ajoute une goutte d'acide acétique et 1 ml. d'aniline et on chauffe le mélange réactionnel 1 heure au bain-marie bouillant. Ensuite on chasse les substances volatiles sous vide et on cristallise le résidu dans un mélange de méthanol et d'acétate d'éthyle. F 107-114°.

Le Rf dans un solvant composé d'acétone, de benzène et

d'eau dans les proportions de 9:2:1, contenant 40 mg. de rhodamine B par litre est 0,68.

3.2 - Synthèse de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate

3.2.1 - Acide glucométasaccharinique-6-phosphate

10 g. du sel de baryum du 3-O-méthyl D-glucose-6-phosphate sont dissous dans 40 ml. d'eau et la solution est versée dans 400 ml. de la baryte 0,3 N. La solution devient vert clair. Au bout de quelques heures la coloration disparaît et la solution devient légèrement turbide. On l'abandonne 2 jours à la température ambiante. Le mélange réactionnel est ensuite neutralisé par addition de la résine Amberlite IR 120 sous sa forme acide. On élimine l'échangeur d'ions par filtration et on ajuste le pH de la solution aqueuse à 8 avec de la baryte. La solution est ensuite concentrée sous vide jusqu'à un petit volume. Le sel de baryum de l'acide glucométasaccharinique cristallise spontanément. On essore les cristaux, les dissout dans la quantité minimale d'eau et on décolore la solution par du noir animal. Après la concentration de la solution aqueuse on sépare les cristaux formés par filtration. La substance ainsi obtenue est analytiquement pure. Par concentration des eaux-mères et addition d'éthanol, on peut obtenir une seconde fraction du produit. Rendement total: 9,4 g.

$$[\alpha]_D^{22} = -5,5^\circ \quad (c = 5, \text{ dans l'eau })$$

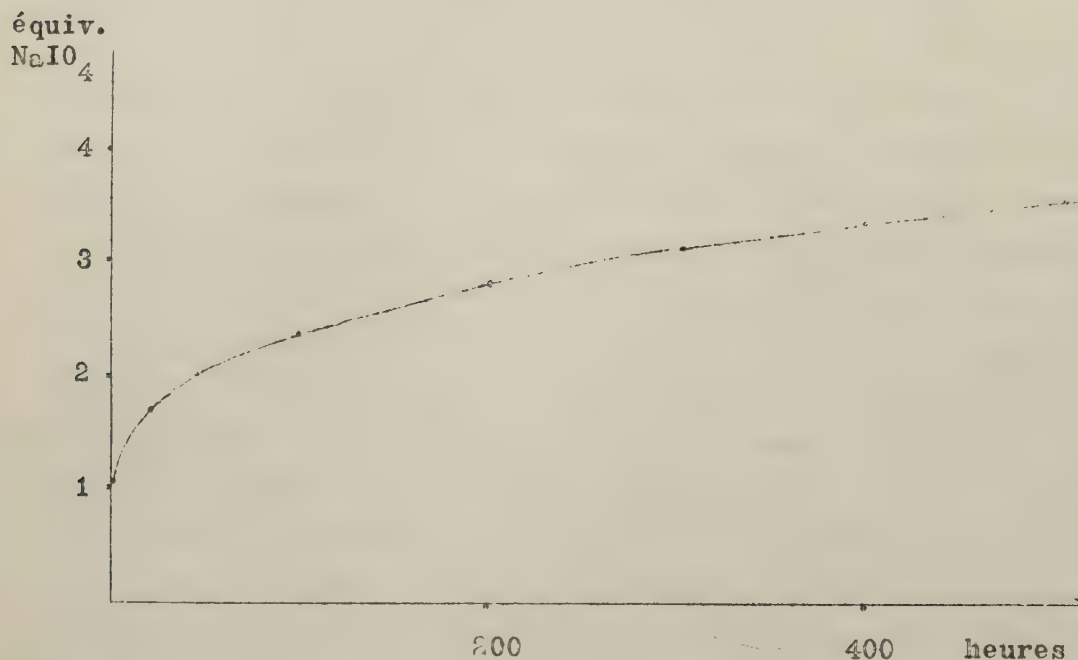
Calculé pour $C_6H_{10}O_9PBa_{1,5} \cdot 2H_2O = 495$

$$C\% = 14,44; \quad H\% = 2,81; \quad P\% = 6,24$$

Trouvé $C\% = 14,57; \quad H\% = 2,79; \quad P\% = 6,14$

Les valeurs Rf sont les suivantes: Solvant A : acide - 0,33
lactone - 0,48. Solvant B : acide - 0,55, lactone - 0,62. Solvant
C : 0,05. Solvant D: 0,13.

La figure suivante représente la vitesse de la réaction du sel de sodium de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate avec un excès de periodate de sodium dans une solution non tamponnée.

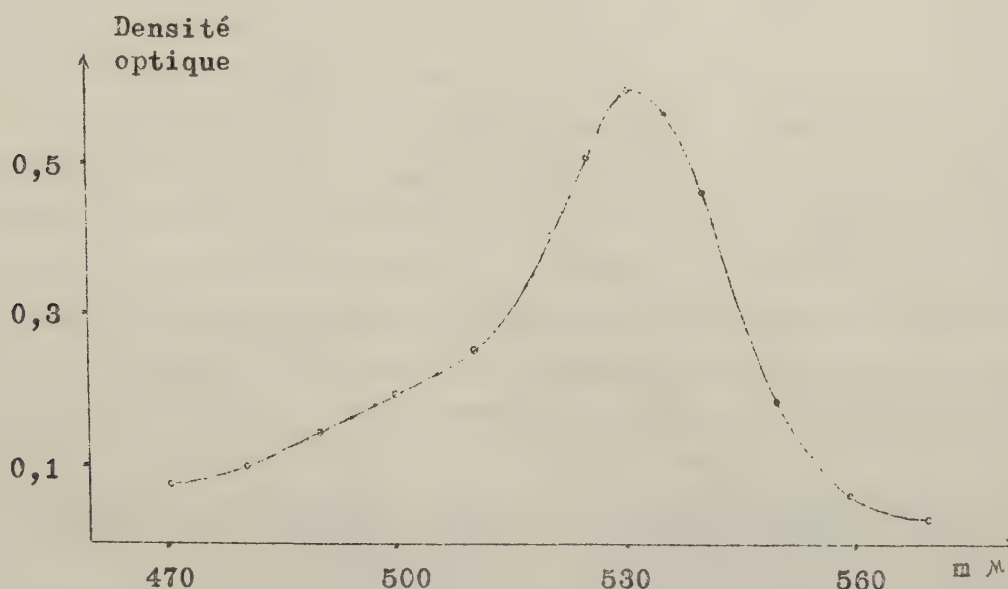


3.2.2 - Détection de dialdéhyde malonique pendant l'oxydation de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate par l'acide periodique.

25 mg de sel de baryum de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate sont dissous dans 10 ml d'eau. On mélange 0,25 ml de cette solution avec le même volume d'une solution d'acide periodique 0,025 N préparée dans l'acide sulfurique 0,125 N. Après 20 minutes on ajoute au mélange réactionnel 0,5 ml d'une solution d'arsénite de sodium à 2% dans l'acide chlorhydrique 0,5 N. Le mélange devient jaune, à cause de libération d'iode. Au bout de 2 minutes la solution devient incolore. On y ajoute alors 2 ml d'une solution d'acide thiobarbiturique à 0,3% ajustée à pH 2 à l'aide de

soude 1 N. Le mélange est ensuite chauffé 10 minutes au bain-marie bouillant et refroidi. Le précipité de sulfate de baryum est éliminé par centrifugation et la densité optique du surnageant mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre.

La courbe ci-dessous représente l'absorption du produit de la réaction décrite.



3.2.3 - Anilide de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate.

On dissout 1 g de sel de baryum de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate dans une petite quantité d'eau. On y ajoute, en agitant, de la résine Amberlite IR 120 sous sa forme acide, jusqu'à disparition des ions baryum dans la solution. On essore la résine, on la lave à l'eau et on évapore la solution aqueuse sous vide. Le résidu huileux est séché sous vide en présence de pentoxyde de phosphore. On ajoute à ce résidu 3 ml d'aniline et de l'éthanol en quantité suffisante pour homogénéiser le mélange réactionnel (moins de 2 ml). On chauffe la solution obtenue pendant une heure au bain-marie bouillant. Ensuite, on chasse sous vide et dans un courant d'azote l'éthanol, l'eau formée pendant la réaction et l'excès d'aniline. Le résidu huileux est dissous dans de l'éthanol. On ajoute à la solution éthanolique chaude de l'acétate d'éthyle

jusqu'au début de cristallisation. Après refroidissement, on sépare les cristaux formés et on les recrystallise dans de l'éthanol et ensuite dans du méthanol. Rendement du sel acide d'anilinium de l'anilide de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate: 100 mg. F. 155-156°.

Calculé pour $C_{18}H_{25}O_8N_2P$ = 428

C% = 50,5 ; H% = 5,85; N% = 6,56; P% = 7,12.

Trouvé C% = 50,27; H% = 5,89; N% = 6,38; P% = 7,38.

Les Rf sont les suivants: Solvant A - 0,71; Solvant préparé par mélange de n-propanol, pyridine et eau dans la proportion 1:1:1 contenant 40 mg de Rhodamine B par litre - 0,41. Ce solvant permet la détection directe des anilides, qui donnent une tache fluorescente dans la lumière ultraviolette. L'acide glucométasaccharinique-6-phosphate donne, dans le même solvant une valeur Rf de 0,11 et le lactone correspondant 0,17.

3.2.4 - Déphosphorylation enzymatique de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate.

On dissout 50 mg de sel de baryum de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate dans un petit volume d'eau. On y ajoute de la résine Amberlite IR 120 sous sa forme d'acide jusqu'à disparition des ion baryum dans la solution. Après élimination de la résine par filtration on mélange cette solution, dont le volume est environ 1,5 ml, avec 10 ml de tampon 0,1 N d'acétate de sodium et d'acide acétique de pH 5,5 et avec une solution de 8 mg de phosphatase acide de blé dans 1 ml d'eau. On abandonne le mélange réactionnel pendant 16 heures à la température ambiante. Ensuite on concentre la solution sous vide, on ajoute de l'éthanol, on sépare le précipité de protéines par filtration et on chasse l'éthanol sous vide. Le résidu est repris dans de l'eau, on y ajoute de la résine Amberlite IR 120 sous sa forme acide jusqu'à ce que la solution soit fortement acide, on élimine l'échangeur d'ions par filtration et on évapore le filtrat sous vide. Le résidu est comparé

sur des chromatogrammes sur papier avec l'acide glucométasaccharinique non phosphorylé et avec du phosphate d'ammonium.

Le résidu est séché en présence de pentoxyde de phosphore sous vide. On le dissout dans 1 ml d'éthanol et on ajoute à cette solution 1 ml d'aniline. Le mélange réactionnel est chauffé pendant une heure au bain-marie bouillant et ensuite évaporé à sec sous vide. Le résidu est comparé sur un chromatogramme avec l'anilide de l'acide glucométasaccharinique non phosphorylé.

Dans les deux cas les produits obtenus par déphosphorylation enzymatique de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate sont identiques aux produits non phosphorylés authentiques.

3.2.5 - Séparation des acides α et β glucométasaccharinique-6-phosphates.

1,6 g de sel de baryum de l'acide α, β glucométasaccharinique-6-phosphate sont dissous dans la quantité minimale d'eau et la solution concentrée sous vide jusqu'à un volume de 3 ml. On abandonne le mélange pendant la nuit et, le lendemain, essore les cristaux formés. On les lave avec 1 ml d'eau froide. Rendement de sel de baryum de l'acide α -glucométasaccharinique-6-phosphate: 0,9 g.

$$[\alpha]_D^{23} = + 26,8^\circ \text{ (C = 2 dans l'eau).}$$

On chauffe le filtrat pendant 10 minutes sur le bain-marie bouillant. Le sel de baryum de l'acide β -glucométasaccharinique-6-phosphate cristallise dans la solution chaude. Les cristaux sont séparés par filtration à chaud et lavés par 1 ml d'eau chaude. Rendement de sel de baryum de l'acide β -glucométasaccharinique-6-phosphate: 0,12 g.

$$[\alpha]_D^{23} = - 9,3^\circ \text{ (C = 1,75 dans l'eau).}$$

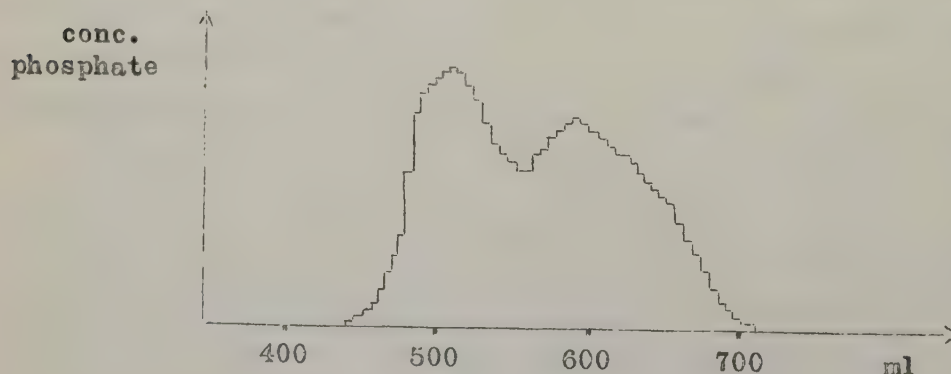
En ajoutant du méthanol au filtrat, on peut obtenir encore 0,4 g de sel de baryum de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate, probablement de l'isomère β .

$$[\alpha]_D^{21} = -9,0 \quad (c = 2,0 \text{ dans l'eau})$$

Les rangs d'élution des acides α et β -glucométasaccharinique-6-phosphates isomères d'une colonne de résine échangeuse d'ions, sont déterminés de la façon suivante: 20 mg de sel de baryum de l'isomère à tester sont dissous dans 10 ml d'ammoniaque 0,001 N et adsorbés sur une colonne de résine Dowex 1 sous sa forme de chlorure, préparée de la façon décrite dans le premier chapitre de la partie expérimentale. Longueur de la colonne: 360 mm; diamètre: 15 mm. La colonne est ensuite lavée par 10 ml d'ammoniaque 0,001 N et l'ester phosphorique élué à l'aide d'une solution de borate de potassium 0,2 M contenant 0,01 M de chlorure de potassium par litre. On recueille des fractions de 5 ml à l'aide d'un collecteur de fractions automatique. Les fractions sont examinées pour la présence de phosphate de la façon déjà décrite.

L'acide α -glucométasaccharinique-6-phosphate est élué entre 475 et 600 ml d'effluent (fractions 95 - 120); le maximum est à 515 ml (fraction 103).

L'acide β -glucométasaccharinique-6-phosphate est élué entre 545 et 675 ml d'effluent (fractions 109 - 135); le maximum est à 590 ml (fraction 118).



3.3 - Dégradations alcalines des phosphates cycliques du glucose.

3.3.1 - Dégradations du glucose-3,6-phosphate cyclique.

3.3.1.1 - Dégradation du glucose-3,6-phosphate cyclique par la baryte à froid.

Cette dégradation a été effectuée exactement de la même manière que la dégradation du 3-0-méthyl-D-glucose-6-phosphate par la baryte (3.2.1). Le produit de la réaction est isolé par concentration de la solution du sel de baryum jusqu'à un faible volume et précipitation du sel cristallin par addition d'éthanol.

Calculé pour $C_6H_{10}O_9PBa_{1,5} \cdot 2H_2O = 495$

C% = 14,44; H% = 2,82; P% = 6,24

Trouvé C% = 14,39; H% = 2,78; P% = 6,29

L'acide glucométasaccharinique-6-phosphate obtenu par cette réaction a les mêmes valeurs Rf que l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate préparé par dégradation du 3-0-méthyl-D-glucose-6-phosphate (3.2.1). Le titrage avec le periodate de sodium des deux acides obtenus par des voies différentes, donne la même courbe de vitesse de la réaction.

3.3.2.1 - Dégradation du glucose-3,6-phosphate cyclique par la baryte à chaud.

100 mg de sel de baryum du glucose-3,6-phosphate cyclique sont dissous dans 4 ml d'eau. On y ajoute 40 ml de baryte 0,3 N et on chauffe le mélange réactionnel sur le bain-marie bouillant à l'abri de dioxyde de carbone de l'air. Au bout d'une heure on laisse refroidir la solution et on élimine l'excès de la base par addition de la résine acide Amberlite IR 120. La résine est séparée par filtration et lavée à l'eau et le filtrat est ensuite ajusté à pH 7,5 par de la baryte. La solution ainsi obtenue est ensuite concentrée sous vide et le sel de baryum de l'acide glucométasaccharinique-6-

phosphate précipité à l'aide d'éthanol. Rendement: 85 mg.

Les Rf du produit ainsi obtenu et la courbe de titrage avec le periodate de sodium sont les mêmes que celles du produit obtenu auparavant (3.2.1).

3.3.1.3 - Dégradation du glucose-3,6-phosphate cyclique par la chaux.

500 mg de sel de baryum de glucose-3,6-phosphate cyclique sont dissous dans 3 ml d'eau. On ajoute à cette solution de la résine acide Amberlite IR 120 jusqu'à disparition des ions baryum. La résine est ensuite séparée par filtration de la solution acide et celle-ci mélangée avec 120 ml d'hydroxyde de calcium 0,045 N. On abandonne le mélange réactionnel pendant deux jours. Ensuite on y ajoute de la résine acide jusqu'à disparition des ion calcium de la solution, filtre et neutralise la solution avec de la baryte. On concentre sous vide et on précipite le sel de baryum de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate à l'aide d'éthanol. Rendement: 470 mg.

Le produit de cette réaction est identique avec l'acide obtenu par les deux autres voies décrites.

3.3.2 - Dégradation du glucose-3,5-phosphate cyclique.

3.3.2.1 - Acide glucométasaccharinique-5-phosphate.

La dégradation alcaline du glucose-3,5-phosphate cyclique par la baryte est effectuée de la même manière que celles du 3-méthyl-glucose-6-phosphate (3.2.1) et du glucose-3,6-phosphate cyclique (3.3.1.1). La solubilité du sel de baryum de l'acide glucométasaccharinique-5-phosphate dans l'eau est encore plus faible que celle du 6-phosphate isomère; sa cristallisation est donc plus facile. A partir de 5 grammes de glucose-3,5-phosphate cyclique nous avons obtenu un rendement de 4,8 g. de sel de baryum de l'acide

glucométasaccharinique-5-phosphate.

Calculé pour $C_6H_{10}O_9PBa_{1,5} \cdot 2H_2O = 495$

C% = 14,44; H% = 2,81; P% = 6,24.

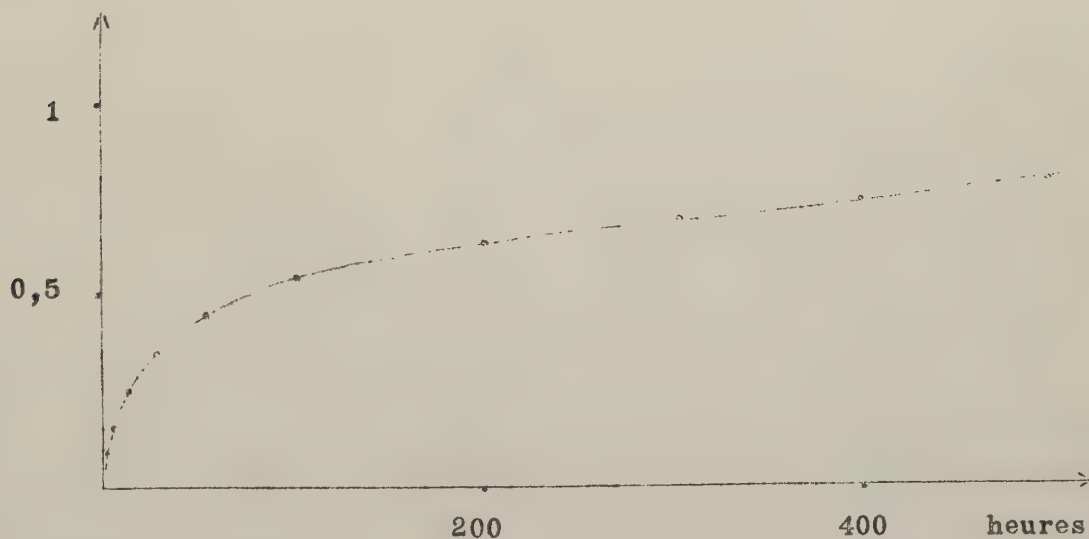
Trouvé C% = 14,85; H% = 2,79; P% = 6,21.

$[\alpha]_D^{22} = -6,7^\circ$ (c = 5, dans l'eau)

Les Rf sont les suivants: Solvant A: acide - 0,32; lactone - 0,48; solvant B: acide - 0,55; lactone - 0,62; solvant D: 0,12.

La vitesse de l'oxydation du sel de sodium de l'acide glucométasaccharinique-5-phosphate avec le periodate de sodium, dans une solution non tamponnée, est représentée par la courbe ci-dessous.

équiv.
NaIO₄



3.3.2.2 - Anilide de l'acide glucométasaccharinique-
5-phosphate.

1 g de sel de baryum de l'acide glucométasaccharinique-5-phosphate est transformé en lactone correspondant selon le mode opératoire donné lors de la description de la préparation de l'anilide de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate (3.2.2). L'huile ainsi obtenue est dissoute dans 2 ml d'éthanol; on y ajoute 3 ml d'aniline et on chauffe le mélange réactionnel pendant une heure au bain-marie bouillant. On chasse ensuite l'éthanol et l'excès d'aniline sous vide. Le résidu solide est cristallisé dans de l'éthanol à 80% et recristallisé dans du méthanol.

Rendement: 380 mg. F. 149-151°.

Calculé pour $C_{18}H_{25}O_8N_2P$ = 428

C% = 50,5; H% = 5,85; N% = 6,56; P% = 7,12.

Trouvé C% = 50,53; H% = 6,01; N% = 6,63; P% = 7,54.

Les Rf sont les suivants: Solvant A: 0,71; Solvant contenant la Rhodamine B, décrit lors de la préparation de l'anilide de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate (3.2.2) : 0,41.

CHAPITRE IV.

Synthèse et réactions du 2-désoxy-D-ribose-5-phosphate.

4.1 - Dégradation de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate selon Ruff.

10 g de sel de baryum de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate sont suspendus dans 50 ml d'eau. On acidifie le mélange par addition de résine Amberlite IR 120 jusqu'à disparition des ions baryum dans la solution. On filtre et lave la résine avec de l'eau. La solution est ensuite neutralisée par une solution de bicarbonate de potassium. Le volume final de la solution du sel de potassium de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate ainsi obtenu est ensuite ajusté à 150 ml par addition d'eau ou par concentration sous vide.

Des volumes égaux de solutions aqueuses de sulfate ferrique à 3,8 % et d'acétate de baryum (monohydraté) à 5 % sont mélangées. On sépare le précipité du sulfate de baryum par centrifugation et obtient ainsi une solution d'acétate ferrique.

40 ml de cette solution sont ajoutés à la solution de sel de potassium de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate préparée comme il est décrit ci-dessus. On chauffe le mélange réactionnel jusqu'à 40° et on y ajoute 10 ml d'eau oxygénée à 30%. La température du mélange monte spontanément à 50° et on observe un dégagement de gaz. Au bout d'une heure, quand la température du mélange réactionnel a atteint la température ambiante, on le chauffe, à nouveau, à 50° et on réajoute 10 ml d'eau oxygénée. Le mélange est ensuite abandonné pendant la nuit. Le lendemain on élimine les cations présents par addition de résine acide Amberlite IR 120,

jusqu'à la disparition des ions ferriques, ce qui est contrôlé par la réaction au sulfocyanure d'ammonium. On sépare la résine par filtration, on la lave avec de l'eau et on réunit les eaux de lavage et le filtrat. La solution acide est ensuite neutralisée par de l'ammoniaque et concentrée à un volume de 100 ml; le pH est ensuite ajusté à 8,5 par addition d'ammoniaque.

4.2 - Isolement du 2-désoxy-D-ribose-5-phosphate.

On prépare une colonne de résine échangeuse d'ions Dowex 2 x10 (200-400 mesh) sous sa forme de sulfate de la manière décrite dans le premier chapitre de la partie expérimentale de ce travail (1.5.2). Le diamètre de la colonne est de 50 mm, la longueur 210 mm. On fait passer à travers cette colonne la solution de sel d'ammonium des produits de la dégradation de Ruff de l'acide glucometasaccharinique-6-phosphate. La colonne est ensuite lavée avec de l'eau (600 ml). Les phosphates adsorbés sur la colonne sont élués par une solution d'acide sulfurique 0,02 N. La vitesse d'élution est de 50 ml par heure. On recueille des fractions de 10 ml à l'aide d'un collecteur de fractions automatique.

Les fractions sont examinées pour la présence de phosphate de la façon déjà décrite. Le désoxyribose est détecté dans l'effluent à l'aide de la réaction de Dische: quelques gouttes de la fraction à examiner sont mélangées avec un double volume du réactif, préparé par la dissolution d'un gramme de diphénylamine dans 100 ml d'acide acétique et addition de 2,75 ml d'acide sulfurique concentré. Le mélange est chauffé au bain-marie bouillant pendant 10 minutes: il bleuit en présence de désoxyribose.

On découvre du phosphate dans le septième, huitième et neuvième litre d'effluent (à partir de la fraction 590 et jusqu'à la fraction 910). Le phosphate inorganique sort de la colonne entre 6600 et 7500 ml d'effluent. Le réactif de Dische donne une réaction positive dans les fractions entre 5900 et 6700 ml. Les fractions

d'effluent entre 5950 et 6500 ml sont réunies et neutralisées par de la baryte sans dépasser le pH 6,5. Le précipité de sulfate de baryum est séparé par filtration et le filtrat concentré sous vide à froid jusqu'à 5 ml. A cette solution on ajoute goutte à goutte 40 ml d'éthanol, ce qui provoque la précipitation du sel de baryum du 2-désoxy-D-ribose-5-phosphate. Le précipité est filtré, lavé par de l'éthanol et séché sous vide en présence d'anhydride phosphorique. Rendement 680 mg.

Calculé pour $C_5H_9O_7 \cdot PBa \cdot 1H_2O = 367$

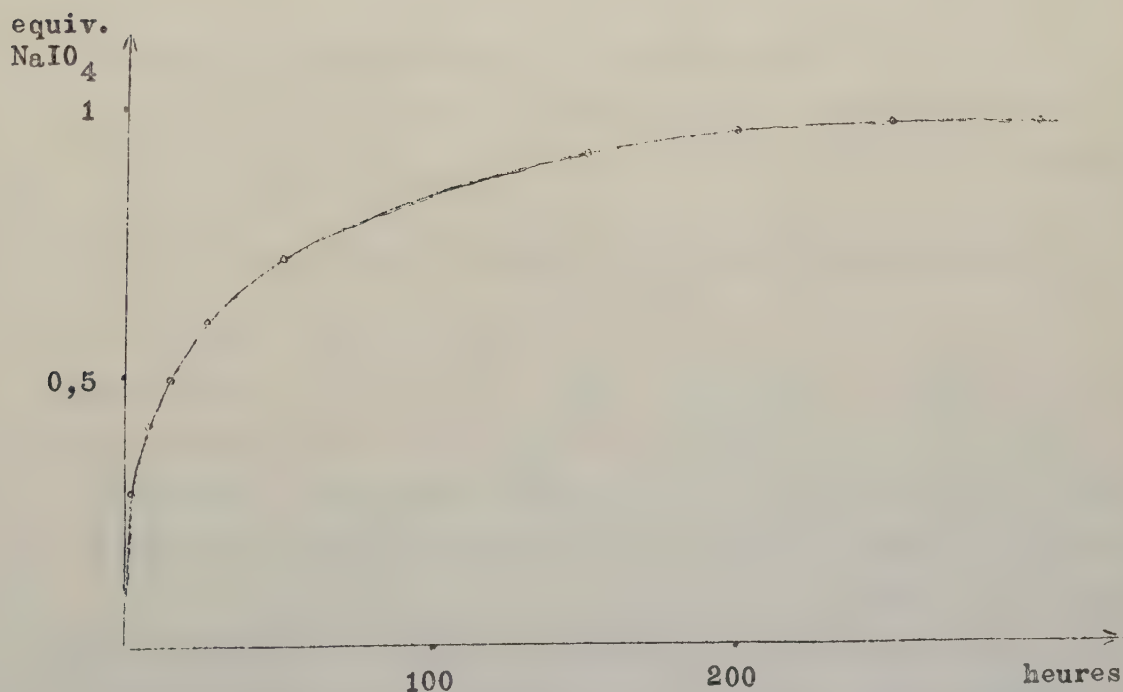
C% = 16,34; H% = 2,99.

Trouvé C% = 16,47; H% = 3,04.

$[\alpha]_D^{20} = -10,1^\circ$ (c = 2,4 dans l'eau)

Les valeurs Rf sont les suivantes: Solvant A: 0,49 ; Solvant B: 0,48.

La substance consomme une mol de periodate en 300 heures.



Les fractions d'effluent entre 7500 et 9100 ml sont réunies et neutralisées par de la baryte ($\text{pH} = 7,5$). On sépare le sulfate de baryum précipité par filtration et on évapore le filtrat sous vide. On obtient alors 5,2 g de sel de baryum de l'acide glucométabolique-6-phosphate très pur.

150 mg de sel de baryum de désoxyribose-5-phosphate sont dissous dans 10 ml d'eau. On fait passer cette solution à travers une colonne de résine échangeuse d'ions - Amberlite IR 120 - sous forme de sel de cyclohexylammonium. L'effluent est évaporé sous vide à froid. On reprend le résidu dans de l'éthanol et on cristallise le sel neutre de cyclohexylammonium du 2-désoxy-D-ribose-5-phosphate par addition d'éther. Après recristallisation des mêmes solvants on obtient un rendement de 120 mg.

La substance donne les mêmes valeurs Rf que le sel de baryum du 2-désoxy-ribose-5-phosphate.

Calculé pour $\text{C}_{17}\text{H}_{37}\text{O}_7\text{N}_2\text{P}\cdot\text{H}_2\text{O} = 430$

C% = 47,44; H% = 9,03; N% = 6,52; P% = 7,21.

Trouvé C% = 47,74; H% = 9,21; N% = 6,71; P% = 6,82.

Le sel de cyclohexylammonium du désoxyribose-5-phosphate, gardé à la température ambiante brunit en quelques jours et devient résineux au bout d'une semaine.

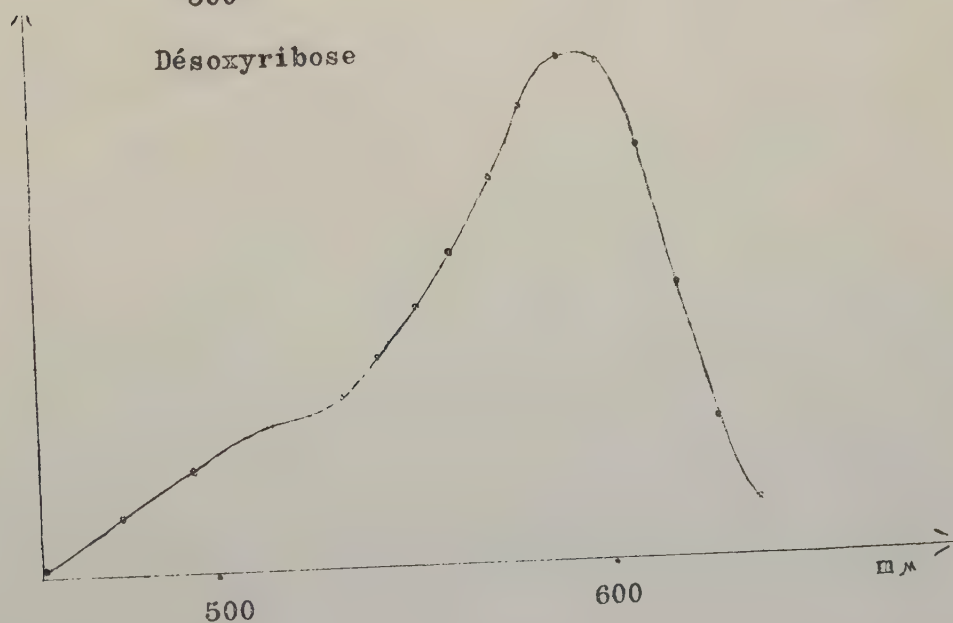
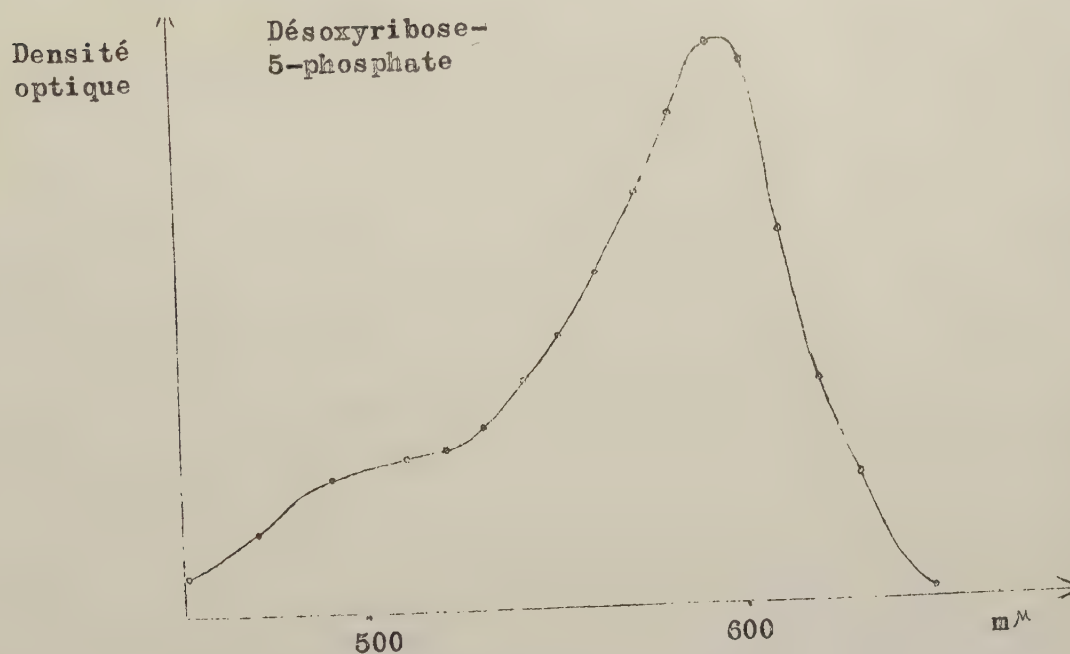
4.3 - Réaction du 2-désoxy-D-ribose-5-phosphate avec le réactif de Dische.

Le réactif de Dische est préparé de la façon suivante: 1 g de diphenylamine recristallisée deux fois dans de l'éthanol aqueux est dissout dans 100 ml d'acide acétique fraîchement distillé. On ajoute à cette solution 2,75 ml d'acide sulfurique concentré. Le réactif est conservé à l'abri de la lumière et doit être refait tous les dix jours.

1 ml de la solution contenant le dérivé du 2-désoxy-ribose est mélangé avec 2 ml du réactif. On chauffe le mélange pendant

10 minutes dans un bain-marie bouillant. Le mélange réactionnel est ensuite refroidi et son spectre déterminé à l'aide d'un spectrophotomètre.

Les courbes d'absorption des produits formés par cette réaction à partir de 2-désoxy-D-ribose-5-phosphate et à partir de 2-désoxy-D-ribose, sont reproduites ci-dessous.



RESUME ET CONCLUSIONS GENERALES.

Le 2-désoxy-D-ribose est le constituant glucidique des acides désoxy-ribonucléiques. Malgré son importance biochimique ni ses propriétés physiques et chimiques, ni son comportement biologique ne sont que très peu étudiés, car jusqu'à ces tout derniers mois ce composé était virtuellement inaccessible. Nous avons entrepris la synthèse de ce phosphate de glucide, afin de le rendre accessible pour des travaux d'enzymologie, de Biochimie et de biologie ainsi que pour étudier son comportement chimique, notamment ses réactions colorées qui servent à déterminer le taux des acides désoxy-ribonucléiques dans les tissus et dans les constituants cellulaires isolés.

Depuis la publication préliminaire décrivant notre synthèse du désoxyribose-5-phosphate, deux travaux consacrés à ce sujet ont été publiés. Dans les deux cas la synthèse est fondée sur la phosphorylation d'un dérivé du désoxyribose, lui-même difficilement accessible, suivie de l'élimination des groupes protecteurs.

Notre synthèse de 2-désoxy-D-ribose-5-phosphate est fondée sur une réaction découverte par KENNER et RICHARDS, selon laquelle les hexoses substitués sur l'atome d'oxygène attaché au troisième atome de carbone du sucre se transforment, en milieu alcalin, en un mélange d'acides α et β métagacchariniques. Ce mélange peut être ensuite dégradé pour donner le 2-désoxypentose correspondant. En partant du 1,2-isopropylidène 6-O-méthyl D-glucose, dont nous avons mis au point une méthode de préparation le rendant facilement accessible, nous avons, par une suite analogue de réactions réussi à obtenir le désoxyribose-5-phosphate avec un rendement de 20%.

Il est bien connu que les triesters de l'acide phosphoriques sont instables si la molécule portant le triester possède un groupe hydroxyle libre voisin: il se forme alors, par cyclisation et élimination, un diester de l'acide phosphorique, cette réaction étant très rapide si le triester se trouve dissous dans un solvant polaire. Pour la phosphorylation du 1,2-isopropylidène 3-0-méthyl D-glucose par le diphényl phosphorochloridate nous avons donc choisi comme solvant le benzène anhydre et utilisé la quantité minimale de pyridine. De même, pour éliminer les réactifs en excès, nous avons employé des résines échangeuses d'ions en milieu benzénique. L'hydrogénolyse du 1,2-isopropylidène 3-0-méthyl D-glucose-6-diphénylphosphate ainsi obtenu, suivie de l'hydrolyse acide du groupe isopropylidène, nous a fourni le 3-0-méthyl D-glucose-6-phosphate. Grâce à ce mode opératoire nous avons pu améliorer le rendement final de ce composé de 4% à 60%.

Pour nous assurer qu'une migration du résidu phosphorique n'a pas eu lieu pendant les opérations successives de cette préparation, nous avons synthétisé le 3-0-méthyl D-glucose-6-phosphate aussi par une autre voie qui, bien qu'avec des rendements moins élevés, donne un produit exempt de contaminants. Pour cela nous avons fait réagir le 1,2-isopropylidène 3-0-méthyl 5,6-anhydro-D-glucofuranose avec le phosphate de potassium et soumis le isopropylidène 3-méthyl-glucose-6-phosphate ainsi obtenu à une hydrolyse acide: le 3-méthyl-glucose-6-phosphate ainsi préparé est identique avec le produit décrit précédemment.

Nous avons transformé le 3-méthyl-glucose-6-phosphate en un mélange d'acides α et β glucométasacchariniques (acides 3-désoxygluconique- et 3-désoxymannonique-6-phosphates) par traitement alcalin. La structure des acides glucométasacchariniques phosphorylés a été démontrée par titrage conductométrique montrant trois dissociations acides, par tirage avec du periodate montrant la présence d'un groupe diol vicinal, par la préparation des anilides et par déphosphorylation enzymatique, cette dernière donnant de l'acide gluco-

métasaccharinique et du phosphate inorganique. Nous avons aussi séparé les isomères α et β glucométasacchariniques et déterminé leur rang d'élution d'une colonne de résine échangeuse d'ions.

Ayant démontré que le résidu phosphorique, lié au troisième carbone du glucose, a les propriétés d'un substituant électrophyle comme les radicaux alcoyl, BROWN, HAYES et TODD ont préparé l'acide glucométasaccharinique par traitement alcalin du glucose-3-phosphate. Il nous semblait donc probable que les phosphates cycliques du glucose, ayant le résidu phosphorique attaché au carbone 3 du sucre donneraient, lors de la dégradation alcaline, des acides glucométasacchariniques phosphorylés. Le 1,2-isopropylidène-3-glucose-3,6-phosphate étant facilement accessible par cyclisation du isopropylidène-glucose-3-phosphate avec le dicyclohexyl-carbodiimide, cette voie de synthèse devait rendre aisé la préparation de l'acide glucométasaccharinique-3-phosphate, tandis que le 5-phosphate devait résulter de la dégradation alcaline du glucose-3,5-phosphate.

Nous avons tout d'abord établi que le 1,2-isopropylidène-glucose-3,5- et -3,6-phosphates peuvent être hydrolysés en milieu acide, pour fournir les glucose-3,5- et -3,6-phosphates sans transesterification ni hydrolyse du cycle phosphorique.

Par titrage du glucose-3,5-phosphate avec le periodate nous avons confirmé la présence d'un seul groupement α -glycolique dans la molécule. En revanche, l'oxydation du glucose-3,6-phosphate par le même réactif ne suit pas le schéma classique de l'oxydation des polyols. Par analogie avec les travaux de HOUGH, portant sur les O-alcoyl oses, nous proposons une suite de réactions qui justifie le taux de periodate consommé par ce phosphate cyclique.

La dégradation alcaline du glucose-3,6-phosphate nous a fourni l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate identique avec le produit de dégradation du 3-méthyl-glucose-6-phosphate. Par la même dégradation du glucose-3,5-phosphate nous avons préparé l'acide glucométasaccharinique-5-phosphate.

Pendant le titrage des acides glucométasacchariniques phosphorylés avec le periodate de sodium nous avons observé une ré-

action complexe. L'acide glucométasaccharinique-5-phosphate consomme un équivalent de periodate, subissant une très lente décarboxylation. L'acide glucométasaccharinique et son 6-phosphate consomment, tous les deux, la quantité de periodate requise pour oxyder leurs systèmes α -glycoliques. On observe ensuite une oxydation lente, mais plus rapide que celle de l'acide glucométasaccharinique-5-phosphate. Cette différence s'explique par la formation et l'oxydation du dialdéhyde malonique, résultant de la décarboxylation de l'acide

β -formyl-lactique, intermédiaire commun, ne pouvant être formé qu'à partir de l'acide glucométasaccharinique et son 6-phosphate.

L'acide glucométasaccharinique-6-phosphate peut être bien distingué du 5-phosphate isomère par titrage avec du periodate ainsi que par les constantes physiques de son anilide. Nos efforts pour séparer les acides glucométasaccharinique-5- et -6-phosphates par chromatographie sur papier, par électrophorèse ou par chromatographie sur colonnes de résines échangeuses d'ions n'ont donné aucun résultat.

La dégradation du mélange des acides glucométasaccharinique-6-phosphates avec l'eau oxygénée en présence de fer trivalent selon RUFF nous a fourni un mélange, dont nous avons pu isoler, à l'aide de chromatographie sur résine échangeuse d'ions le 2-désoxy-D-ribose-5-phosphate avec un rendement de 20%.

Malgré le rendement modeste de la dernière étape de notre synthèse, elle a rendu le 2-désoxy-D-ribose-5-phosphate relativement aisément accessible. Nous sommes convaincus que la suite des réactions établie dans ce travail, surtout la voie partant du glucose-2,6-phosphate, servira pour la préparation de ce corps et facilitera les recherches biochimiques dans le domaine des acides nucléiques ainsi que les travaux portant sur le métabolisme glucidique cellulaire.

BIBLIOGRAPHIE.

- 1 - F. MIESCHER, Hoppe-Seylers Med.Chem.Unters., 1871, 441
- 2 - P.A. LEVENE, E.S. LONDON, J.Biol.Chem., 81, 711 (1929)
- 3 - P.A. LEVENE, E.S. LONDON, J.Biol.Chem., 83, 793 (1929)
- 4 - P.A. LEVENE, L.A. MIKOSHA, T. MORI, J.Biol.Chem., 85, 785
(1930)
- 5 - A. STOLK, Naturwiss., 47, 88 (1960)
- 6 - L.A. MANSON, J.O. LAMPEN, J.Biol.Chem., 191, 87 (1951)
- 7 - C.E. CARTER, J.Am.Chem.Soc., 73, 1537 (1951)
- 8 - F.K. BAGATELL, E.W. WRIGHT, H.Z. SABLE, Biochim.Biophys. Acta,
28, 216 (1958)
- 9 - B.L. KORECKER, P.Z. SMYRNIOTIS, J.E. SEEGMILLER, J.Biol.Chem.
193, 383 (1951)
- 10 - A. WACKER, S. KIRSCHFELD, L. TRÄGER, Z.Naturforsch., 14b,
145 (1959)
- I.A. ROSE, B.S. SCHWEIGERT, J.Biol.Chem., 202, 635 (1953)
- 11 - L.A. MANSON, J.O. LAMPEN, J.Biol.Chem. 191, 95 (1951)
- 12 - H.L.A. TARR, Chem. and Ind., 1957, 625
- 13 - A. KORNBERG, J. LIEBERMAN, E.S. SIMMS, J.Biol.Chem., 215,
389 (1955)
- 14 - H. KLENOW, R. EMERLAND, Arch.Biochem.Biophys., 58, 275 (1955)
- 15 - E. RACKER, Nature, 167, 408 (1951)
- 16 - E. RACKER, J.Biol.Chem., 196, 347 (1952)
- 17 - M.G. Mc GEOWN, F.H. MALPRESS, Nature, 170, 575 (1952)
- 18 - M.C. LANNING, S.S. COHEN, J.Biol.Chem., 216, 413 (1955)
- 19 - B.W. AGRANOFF, R.O. BRADY, J.Biol.Chem., 219, 221 (1956)
- 20 - A. GINSBURG, J.Biol.Chem., 234, 481 (1959)
- 21 - L.A. MANSON, J.O. LAMPEN, J.Biol.Chem., 193, 539 (1951)
- 22 - J. JONSEN, S. LALAND, A. STRAND, Biochim.Biophys.Acta, 32,
117 (1959)

- 23 - C.E. HOFFMANN, J.O. LAMPEN, J.Biol.Chem., 193, 385 (1952)
- 24 - G.F. DOMAGK, B.L. HORECKER, J.Biol.Chem., 233, 283 (1953)
- 25 - R. ALLERTON, W.G. OVEREND, M. STACEY, Chem.and Ind., 1952, 952
- 26 - J. KENNER, G.N. RICHARDS, J.Chem.Soc., 1954, 278
- 27 - J. KENNER, G.N. RICHARDS, J.Chem.Soc., 1957, 3019
- 28 - O. RUFF, Ber., 31, 1573 (1896)
- 29 - G.N. RICHARDS, J.Chem.Soc., 1954, 3638
- 30 - J.C. SOWDEN, J.amer.chem.Soc., 76, 3541 (1954)
- 31 - H. VENNERT, Naturwiss., 43, 278 (1956)
- 32 - E. HARDEGGER, M. SCHELLENBAUM, R. HUWYLER, A. ZÜST,
Helv.Chim.Acta, 40, 1815 (1957)
- 33 - S. LEWAK, R. DERACHE, L. SZABO, C.R.Acad.Sci., 248, 1337 (1959)
- 34 - D.L. Mac DONALD, H.G. FLETCHER Jr., J.amer.chem.Soc., 81, 3719
(1959)
- 35 - T. UKITA, K. NAGASAWA, Chem. and Pharm.Bull. (Japan), 7, 655
(1959)
- 36 - I. MANDL, C. NEUBERG, Arch.Bioch.Biophys., 33, 191 (1951)
- 37 - I. MANDL, C. NEUBERG, Arch.Bioch.Biophys., 37, 83 (1952)
- 38 - J.E. SEEGMILLER, B.L. HORECKER, J.Biol.Chem., 192, 175 (1951)
- 39 - N. ENTNER, M. DOUDOROFF, J.Biol.Chem., 196, 853 (1952)
- 40 - J. Mac GEE, M. DOUDOROFF, J.Biol.Chem., 210, 617 (1954)
- 41 - R. KOVACHEVICH, W.A. WOOD, J.Biol.Chem., 213, 745 (1955)
- 42 - R. KOVACHEVICH, W.A. WOOD, J.Biol.Chem., 213, 757 (1955)
- 43 - J. De LEY, M. DOUDOROFF, J.Biol.Chem., 227, 745 (1957)
- 44 - D.H. LEVIN, E. RACKER, Arch.Bioch.Biophys., 79, 396 (1959)
- 45 - F. DICKENS, Biochem.J., 32, 1645 (1938)
- 46 - A. WEISSBACH, J. HURWITZ, J.Biol.Chem., 234, 705 (1959)
- 47 - J. HURWITZ, A. WEISSBACH, J.Biol.Chem., 234, 710 (1959)
- 48 - P. REGNA, B.P. CALDWELL, J.amer.chem.Soc., 66, 243 (1944)
- 49 - D.M. BROWN, F. HAYES, A.R. TODD, Ber., 90, 936 (1957)
- 50 - E. PELIGOT, C.R.Acad.Sci., 7, 106 (1838)
- 51 - SCHEIBLER, Ber., 13, 2212 (1880)
- 52 - G.J. MÜLDER, J.pract.Chem., 21, 203 (1840)

- 53 - A.F. von GROTE, B. TOLLENS, Ber., 7, 1375 (1875)
54 - H. KILIANI, Ber., 16, 2625 (1883)
55 - H. KILIANI, H. SANDA, Ber. 26, 1649 (1893)
56 - J.U. NEF, Ann., 376, 1 (1910)
57 - W.M. CORBETT, J. KENNER, J.Chem.Soc., 1955, 1431
58 - J. KENNER, G.N. RICHARDS, J.Chem.Soc., 1954, 1784
59 - J. KENNER, G.N. RICHARDS, J.Chem.Soc., 1954, 3277
60 - H. KILIANI, Ber., 18, 642 (1885)
61 - H. KILIANI, P. LOEFFLER, Ber., 88, 2667 (1905)
62 - H.S. ISBELL, J.Research Natl.Bur.Stand., 32, 45 (1944)
63 - H. van GRUNENBERG, C. BERDT, W. FREUDENBERG, J.amer.chem.Soc.
60, 1507 (1938)
64 - W.L. GLEN, G.S. MYERS, G.A. GRANT, J.Chem.Soc., 1951, 2568
65 - K. FREUDENBERG, W. DÜRR, H. von HOCHSTETTER, W.JACOBI, H.
van HOVE, A. NOE, E. GARTNER, Ber., 61, 1735 (1928)
66 - H.W. COLES, L.D. GOODHUE, R.M. HIXON, J.amer.chem.Soc., 51,
523 (1929)
67 - J.C. IRVINE, J.P. SCOTT, J.Chem.Soc., 103, 571 (1913)
68 - J.C. IRVINE, HOGG, J.Chem.Soc., 105, 1391 (1914)
69 - K. FREUDENBERG, W. DÜRR, H. von HOCHSTETTER, Ber., 61B, 1735
(1928)
70 - E. FISCHER, Ber., 47, 2060 (1910)
71 - H.S. FORREST, A.R. TODD, J.Chem.Soc., 1950, 3295
72 - E. BAER, Biochem. Preparations, 2, 25, 31 (1952)
73 - P. BRIGL, H. MÜLLER, Ber., 72, 2121 (1939)
74 - F.R. ATHERTON, H.T. OPENSHAW, A.R. TODD, J.Chem.Soc., 1945, 382
75 - P. SZABÓ, L. SZABÓ, résultats non publiés
76 - T. UKITA, N.A. BATES, H.E. CARTER, J.Biol.Chem., 216, 867 (1955)
77 - T. UKITA, K. NAGASAWA, M. IRIE, Pharmaceutical Bull.(Japan),
5, 121 (1957)
78 - T. UKITA, K. NAGASAWA, M. IRIE, Pharmaceutical Bull. (Japan),
5, 128 (1957)
79 - E. OHLE, L.v. VARGHA, H. ERLBACH, Ber., 61B, 1211 (1928)

- 80 - H. OHLE, L. v. VARGHA, Ber., 62, 2435 (1929)
- 81 - H. OHLE, K. TESSMAR, Ber., 71, 1843 (1938)
- 82 - E. OHLE, E. EULER, W. MALERCZYK, Ber., 69B, 1636 (1936)
- 83 - H. OHLE, H. FRIEDENBERG, G. HAESELER, Ber., 69B, 2311 (1936)
- 84 - H. OHLE, M. ANDREE, Ber., 71B, 27 (1938)
- 85 - E. OHLE, W. MERTENS, M. ANDREE, E. EULER, Ber., 68B, 2176
(1935)
- 86 - G.P. LAMPSON, H.A. LARDY, J.Biol.Chem., 181, 693 (1949)
- 87 - H. MASAMUNA, M. MAKI, Tokoku J.Exptl.Med., 55, 299 (1952)
C.A., 47, 11303 (1953)
- 88 - J.W. GREEN, J.amer.chem.Soc., 76, 5791 (1954)
- 89 - J.W. GREEN, J.amer.chem.Soc., 78, 1894 (1956)
- 90 - E. EEGRIWE, Z.anal.Chem., 95, 323 (1933)
- 91 - M. MACHEBOEUF, J. DELSAL, Bull.Soc.Chim.biol., 25, 116 (1943)
- 92 - P. SZABÓ, L. SZABÓ, C.R.Acad.Sci., 249, 1243 (1959)
- 93 - P. SZABÓ, Thèse, Université de Paris, 1959.
- 94 - L.von VARGHA, Ber., 66, 708 (1933)
- 95 - D.J. BELL, J.Chem.Soc., 1936, 859
- 96 - J. HONEYMAN, J.W.W. MORGAN, Chem. and Ind., 1953, 1035
- 97 - D.J. BELL, J.Chem.Soc., 1936, 1553
- 98 - H. OHLE, E. DICKHÄUSER, Ber., 58, 2593 (1925)
- 99 - J.G. MOFFATT, H.G. KHORANA, J.amer.chem.Soc., 79, 1194 (1957)
- 100 - C.W. PARR, Biochem.J., 56, XXVII (1954)
- 101 - H.G. BOMAN, Biochim.Biophys.Acta, 16, 245 (1955)
- 102 - H.G. PONTIS, N.L. BLUMSON, Biochim.Biophys.Acta, 27, 618 (1958)
- 103 - T.K. LAKSMANAN, S. LIEBERMAN, Arch.Biochem.Biophys., 53, 258
(1954)
- 104 - W.E. COHN, J.amer.chem.Soc., 72, 1471 (1950)
- 105 - R.C. HOCKETT, C.S. HUDSON, J.amer.chem.Soc., 56, 1632 (1934)
- 106 - R.C. HOCKETT, J.amer.chem.Soc., 57, 2260 (1935)
- 107 - J.G. BUCHANAN, C.A. DEKKER, A.G. LONG, J.Chem.Soc., 1950, 3162
- 108 - Z. DISCHE, Mikrochemie, 8, 4 (1930)
- 109 - P.F. FLEURY, J.E. COURTOIS, C.R.Acad.Sci., 223, 633 (1946)

- 110 - D.B. SPRINSON, E. CHARGAFF, J.Biol.Chem., 164, 433 (1946)
- 111 - C.F. HUEBNER, S.R. AMES, E.C. BUBL, J.amer.chem.Soc., 68
1621 (1946)
- 112 - R.A. EDINGTON, E.L. HIRST, E.E. PERCIVAL, J.Chem.Soc., 1955
2281
- 113 - L. HOUGH, T.J. TAYLOR, G.E.S. THOMAS, B.M. WOODS, J.Chem.Soc.,
1958, 1212
- 114 - M.L. WOLFROM, J.M. BOBBITT, J.amer.chem.Soc., 78, 2489 (1956)
- 115 - L. HOUGH, M.B. PERRY, Chem. and Ind., 1956, 768
- 116 - L. HOUGH, B.M. WOODS, Chem. and Ind., 1957, 1421
- 117 - F.S. HEAD, Chem. and Ind., 1958, 38
- 118 - M. CANTLEY, L. HOUGH, A.O. PITTET, Chem. and Ind., 1959, 1126
- 119 - M. CANTLEY, L. HOUGH, A.O. PITTET, Chem. and Ind., 1959, 1253
- 120 - J.X. KHYM, O.G. DOHERTY, W.E. COHN, J.amer.chem.Soc., 76,
5523, (1954)
- 121 - J.C.P. SCHWARZ, M. MACDOUGALL, J.Chem.Soc., 1956, 3065
- 122 - L. HOUGH, B.M. WOODS, M.B. PERRY, Chem. and Ind., 1957, 1100
- 123 - J.E. COURTOIS, M. RAMET, Bull.Soc.Chim.biol., 27, 610 (1945)
- 124 - P. FLEURY, S. BOISSON, C.R.Acad.Sci., 204, 1264 (1937)
- 125 - J.E. COURTOIS, M. GUERNET, Ann.pharm.fr., 16, 119 (1958)
- 126 - M.J. CLANCY, W.J. WHELAN, Chem. and Ind., 1959, 678
- 127 - V.S. WARAVDEKAR, L.D. SASLAW, J.Biol.Chem., 234, 1945 (1959)
- 128 - J.B. LEE, J.Chem.Soc., 1960, 1474

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
PARTIE THEORIQUE	
Chapitre I - Synthèse de l'acide glucométasaccharinique-6-phosphate à partir de 3-méthylglucose	16
Chapitre II - Synthèses des acides glucométasacchariniques phosphorylés par la dégradation alcaline des phosphates cycliques du glucose.....	33
Chapitre III - Préparation et caractéristiques du 2-désoxy-D-ribose-5-phosphate.....	44
Chapitre IV - Réactions des glucides phosphorylés avec le periodate.....	48
PARTIE EXPERIMENTALE	
Chapitre I - Méthodes générales.....	64
Chapitre II - Synthèses des phosphates du glucose.....	70
Chapitre III - Dégradation alcalines des phosphates de glucose.....	86
Chapitre IV - Synthèse et réactions du 2-désoxy-D-ribose-5-phosphate.....	98
RESUME ET CONCLUSIONS GENERALES.....	103
BIBLIOGRAPHIE.....	107

